

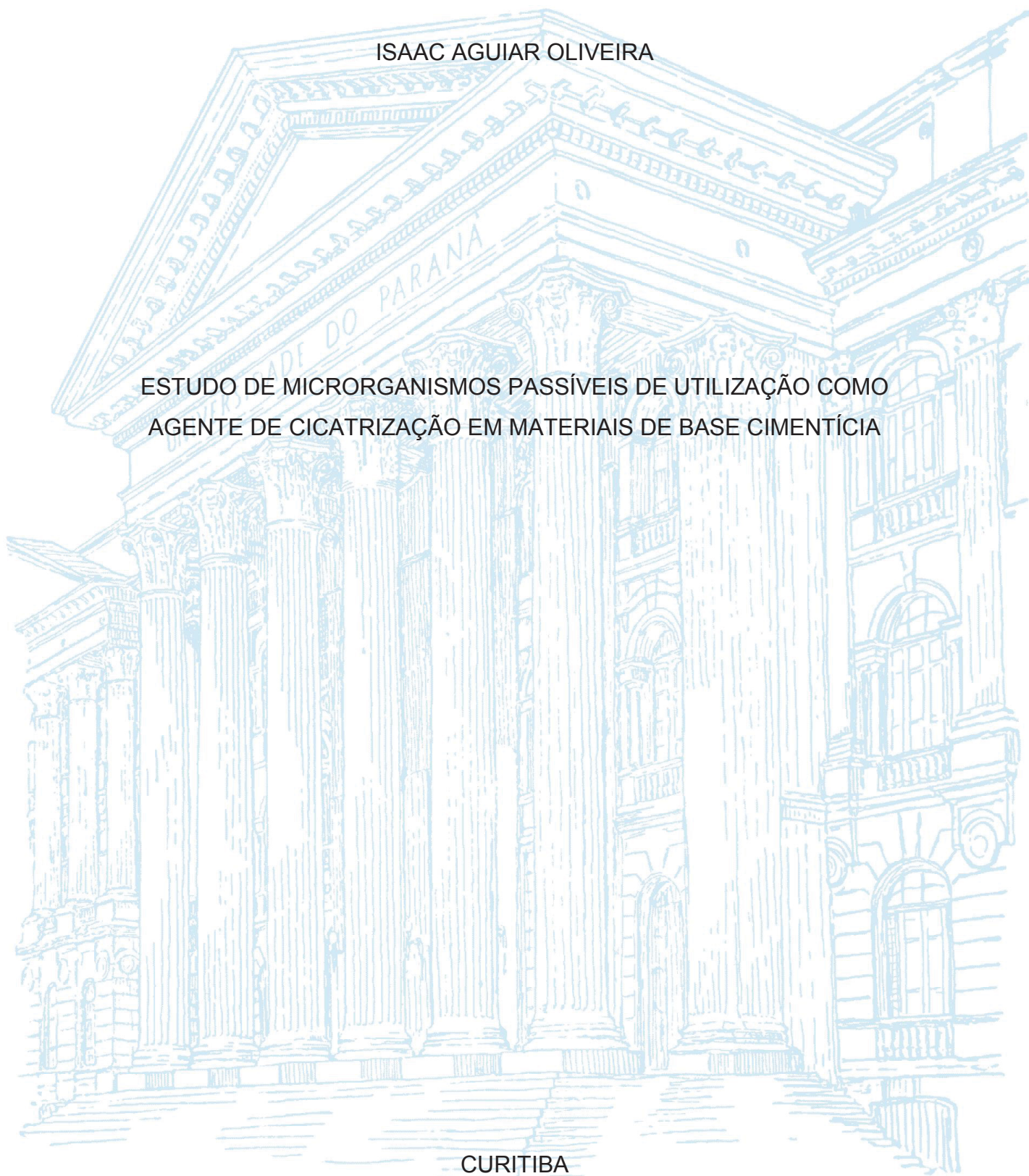
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ISAAC AGUIAR OLIVEIRA

ESTUDO DE MICRORGANISMOS PASSÍVEIS DE UTILIZAÇÃO COMO  
AGENTE DE CICATRIZAÇÃO EM MATERIAIS DE BASE CIMENTÍCIA

CURITIBA

2019



ISAAC AGUIAR OLIVEIRA

ESTUDO DE MICRORGANISMOS PASSÍVEIS DE UTILIZAÇÃO COMO  
AGENTE DE CICATRIZAÇÃO EM MATERIAIS DE BASE CIMENTÍCIA

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Construção Civil, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Construção Civil, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo H. F. de Medeiros  
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Caron

CURITIBA

2019

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

O48m

Oliveira, Isaac Aguiar

Microrganismos passíveis de utilização como agente de cicatrização em materiais de base cimentícia / Isaac Aguiar Oliveira. – Curitiba, 2019.

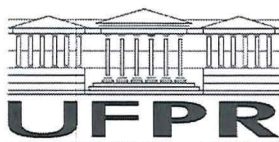
Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Construção Civil, 2019.

Orientador: Marcelo Henrique Farias de Medeiros. Coorientador: Luiz Felipe Caron

1. Microrganismos. 2. Carbonato de cálcio. 3. Autocicatrização. I. Universidade Federal do Paraná. II. Medeiros, Marcelo Henrique Farias de. III. Caron, Luiz Felipe. IV. Título.

CDD: 615.9529

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE  
CONSTRUÇÃO CIVIL - 40001016049P2

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE CONSTRUÇÃO CIVIL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de ISAAC AGUIAR OLIVEIRA intitulada: **Estudo de microrganismos passíveis de utilização como agente de cicatrização em materiais de base cimentícia**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

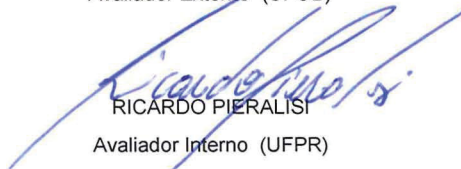
CURITIBA, 24 de Maio de 2019.



MARCELO HENRIQUE FARIAS DE MEDEIROS  
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



JUAREZ HOPPE FILHO  
Avaliador Externo (UFOB)



RICARDO PIERALISI  
Avaliador Interno (UFPR)



## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por me conceder a capacidade e oportunidade de me aprimorar academicamente.

À minha querida esposa Glaucia e ao meu querido filho Joaquim por sempre me apoiarem e estarem presentes em todos os momentos deste trabalho. Eu amo vocês!

Ao meu grande amigo e companheiro de pós-graduação Mauro, por toda a parceria nesse período, muito obrigado!

Ao Professor Carlos Gustavo da PUC-PR por acreditar na pesquisa e abrir as portas dos laboratórios da PUC para realizarmos este trabalho. Um agradecimento especial a todos os técnicos envolvidos e que me ajudaram nesse período. Ao João e Wesley do Lab. de Argamassa, à Silvana e Aline do Lab. de Análises Ambientais, ao Mauro, Jean e Josilene da Usina Piloto da PUC-PR (Lab. de Microbiologia) e à Jessica do Departamento de Eng. Mecânica pelo auxílio nos ensaios de DRX e MEV.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Marcelo Medeiros, pela paciência, transparência e sinceridade em me conduzir neste trabalho. Muito obrigado!

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Luiz F. Caron por acreditar nessa pesquisa e dar-me suporte na parte biológica do trabalho. Meu agradecimento especial a todos da Imunova Análises Biológicas, obrigado!

Ao Guilherme, Júlia, Juliane e Maria Cecília por estarem presentes ajudando-me nos experimentos deste trabalho. Um agradecimento especial à minha amiga e agora colega de pós-graduação Dayane Miranda por estar presente em toda a fase inicial de concepção do trabalho, muito obrigado!

Muito obrigado!

*“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre ombros de gigantes”*  
Isaac Newton (1643 - 1727)

## RESUMO

Os materiais de base cimentícia podem deteriorar-se sob atividades físicas e químicas e bem como de ações biológicas. Todavia, determinados tratamentos de conservação têm sido aplicados para tentar minimizar o efeito dessa degradação. Esses tratamentos, por sua vez, estão sujeitos a frequentes controvérsias em função de que alguns podem não resolver o problema e possuírem limites de performance e durabilidade. Neste aspecto, técnicas denominadas de autocicatrização de fissuras têm sido pesquisadas como forma de aumentar a vida útil das edificações. Entre essas técnicas está o uso de microrganismos capazes de depositar carbonatos resultantes de suas atividades metabólicas. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é desenvolver um método de classificação capaz de selecionar em um conjunto de microrganismos os que podem ser aplicados em estruturas de base cimentícia projetando a sua autocicatrização. Foram adquiridas 23 amostras de microrganismos, no qual: 4 são amostras de *Lysinibacillus sphaericus*, 1 de *Bacillus megaterium*, 1 de probiótico contendo mescla de dois microrganismos (*Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*) e 17 amostras de microrganismos coletadas de aquários de vida marinha. Essas amostras foram submetidas a um meio de cultura nutricional chamado Ágar/Caldo Nutriente e adicionada uma concentração de 5 g/L de 4 reagentes ricos em cálcio. Após a coleta do precipitado dos microrganismos as amostras foram submetidas a ensaios de caracterização: DRX, MEV e EDS. As amostras também foram submetidas a uma variação do pH do meio de cultura base (pH 9, 10, 11 e 12), para: 1º simular o meio alcalino de uma estrutura de base cimentícia e 2º verificar se os microrganismos serão capazes de sobreviver a este meio. Os microrganismos *Lysinibacillus sphaericus* e os do probiótico (*Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*) apresentaram crescimento nos meios estipulados, precipitaram compostos químicos de carbonatos de cálcio e apresentaram crescimento em pH alcalino, logo os mesmos são passíveis de utilização como agente de cicatrização em materiais de base cimentícia. O *Bacillus megaterium* não apresentou crescimento no nutriente Ágar/Caldo nutriente e foi desconsiderado nas análises de caracterização e pH. Dentre as 17 amostras dos microrganismos marinhos, o que melhor apresentou desempenho em relação à precipitação de carbonatos de cálcio e crescimento em meio alcalino foi o denominado M-12. De uma maneira geral os microrganismos marinhos tiveram desempenhos similares aos citados na literatura, o que abre frente para pesquisa de novos microrganismos autocicatrizantes.

Palavras-chave: Microrganismos. Carbonato de cálcio. Meio nutriente. Autocicatrização.

## ABSTRACT

Cement-based compounds can be deteriorate in physical, chemical and biological activities. However certain conservation treatments have been applied to try to minimize the effect of this degradation. Those treatments, in turn, it are subject to frequent controversies, because some may not solve the problem and have limits of performance and durability. In this regard, self-healing techniques have been researched as a way to increase the useful life of buildings. Among these techniques is the use of microorganisms capable of depositing carbonates resulting from their metabolic activities. In this context, the aim of this work is to develop a classification method to select from a set of microorganisms those that can be applied in cement-based structures, projecting their self-healing. 23 microorganisms samples were obtained, in which: 4 samples of *Lysinibacillus sphaericus*, 1 of *Bacillus megaterium*, 1 of probiotic containing two microorganisms (*Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*) and 17 samples of microorganisms collected from marine life aquaria were collected. These samples were submitted to a nutritional culture Agar/Nutrient Broth and varied a 5 g/L addition of 4 calcium rich reagents. After the collection of the precipitate the samples were submitted to characterization tests: XRD, SEM and EDS. The samples were also subjected to a variation of the pH of the culture medium (pH 9, 10, 11 and 12) to: 1° simulate the medium of the cementitious base structure and 2° to verify if the microorganisms will be able to survive the medium alkali. The microorganisms *Lysinibacillus sphaericus* and those of the probiotic (*Bacillus subtilis* and *Bacillus cereus*) presented growth in the stipulated media, precipitated chemical compounds of calcium carbonates and presented growth in alkaline pH, so they can be used as a healing agent in materials of the cementitious base. The microorganism *Bacillus megaterium* didn't present growth in the nutrient Agar/Nutrient Broth and was disregarded in the characterization test and pH analyzes. Among the 17 samples of marine microorganisms, the best performance in relation to the precipitation of calcium carbonates and growth in alkaline medium was the so-called M-12. In general, the marine microorganisms had performances similar to those mentioned in the literature, which open up for the research of new self-healing microorganisms.

Key-words: Microorganisms. Calcium carbonate. Nutrient medium. Self-healing.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Formas comuns das Bactérias: (a) cocos - estreptococos. (b) bacilos - bacilo isolado. (c) espirais - espirilos. Imagens de microscopia eletrônica de varredura - magnitude  $2\mu\text{m}$ ..... 30
- Figura 2 - Formação dos esporos: (a) formação do endósporo por esporulação, fase de células de *Clostridium pascui*. (b) endósporo de *Bacillus anthracis*, MET- $1\mu\text{m}$  ..... 30
- Figura 3 - Tipos de autocicatrização. (a) cápsulas. (b) tubos. (c) intrínseca .... 34
- Figura 4 - Imagem da superfície da viga fissurada. (A) viga com fissuras de 0,3mm. (B) viga com fissuras de 0,8mm ..... 36
- Figura 5 - Diferentes dimensões de fissuras, de 0,1 mm a 1,0 mm (gráfico da taxa de porcentagem de área reparada (%) x autocicatrização / dia) ..... 37
- Figura 6 - Autocicatrização em cp's com adição de argila expandida embebida com bacillus e nutriente para cicatrização. (A) amostra submersa em água por 28 dias. (B) amostra submersa em água por 56 dias. .... 38
- Figura 7 - (A) amostra controle. (B) tratamento com *Bacillus sphaericus* + cloreto de cálcio sem o revestimento em sílica-gel. (C) tratamento com *Bacillus sphaericus* revestida em sílica-gel + acetato de cálcio. .... 39
- Figura 8 - Quadro com alguns trabalhos acadêmicos que apresentam a técnica de difratometria de raios-X (DRX) para indicar os produtos formados nas fissuras colmatadas ..... 40
- Figura 9 - (A) superfície não tratada - a/c = 0,5. (B) e (C) cristais da precipitação bacteriana com dimensão de cerca de  $100\mu\text{m}$ ..... 41
- Figura 10 - (A) superfície não tratada - a/c = 0,7. (B) e (C) cristais da precipitação bacteriana com dimensões cerca de  $100\mu\text{m}$ . ..... 41

|  |    |
|--|----|
| Figura 11 - Desenvolvimento da resistência à compressão ( $\text{N/mm}^2$ ) x idade (dias)<br>- (concreto bacteriano) .....  | 43 |
| Figura 12 - Amostra controle e amostra com adição da bactéria <i>sporosarcina pasteurii</i> (Gráfico - tensão $\text{N/mm}^2$ x tempo-dias).....   | 44 |
| Figura 13 - Representação das reações bioquímicas na parede celular de uma<br>bactéria.....  | 46 |
| Figura 14 - Fluxograma da sequência de atividades para o teste dos<br>microrganismos .....   | 47 |
| Figura 15 - Placas de Petri contendo os microrganismos coletados dos aquários<br>de vida marinha - placas com Ágar Sangue e Ágar Mcconkey .....  | 54 |
| Figura 16 - Processo de execução do meio nutriente líquido: (A) aquecimento do<br>meio nutriente para uniformização. (B) e (C) frasco reagente com meio<br>nutriente pronto para autoclave ..... | 55 |
| Figura 17 - Tubos Reagentes (50 ml).....   | 56 |
| Figura 18 - Ilustração da execução da Inoculação .....   | 56 |
| Figura 19 - Capela de fluxo laminar .....  | 57 |
| Figura 20 - (A) ágar nutriente. (B) placas de petri (90 x 15 mm) - estéril /<br>descartável. (C) placas de petri com ágar nutriente sendo preparadas<br>.....                                    | 58 |
| Figura 21 - Espectro de radiação eletromagnética .....   | 60 |
| Figura 22 - Esquema de funcionamento de um Espectrofotômetro .....   | 61 |
| Figura 23 - Procedimento de contagem em placas e diluições seriadas.....   | 63 |
| Figura 24 - Dluição seriada - espalhamento do inóculo na placa de petri pela alça<br>drigalski .....   | 64 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 25 - Esquema da Câmara de Neubauer e suas demarcações.....   | 64 |
| Figura 26 - A esquerda tubo de ensaio com duas gotas de fucsina e a direita<br>microorganismo corados .....                                     | 65 |
| Figura 27 - Estufa com agitação com as amostras microbianas .....   | 67 |
| Figura 28 - Precipitado dos microrganismos .....  | 67 |
| Figura 29 - Coleta do Precipitado e recipientes plásticos.....  | 68 |
| Figura 30 - Gráfico de crescimento dos microrganismos no meio de cultura Caldo<br>Nutriente .....   | 71 |
| Figura 31 - Diluição Seriada: Placas de Ágar Nutriente .....  | 73 |
| Figura 32 - Contagem pela Câmara de Neubauer. Meio de cultura Caldo<br>Nutriente.....   | 76 |
| Figura 33 - Leitura da Absorbância (ABS) dos microorganismo na presença do<br>meio de cultura Caldo Nutriente .....                             | 78 |
| Figura 34 - Leitura da Absorbância (ABS) dos microorganismo na presença do<br>meio de cultura Caldo Nutriente com adição de Lactato de Cálcio . | 79 |
| Figura 35 - Amostras de precipitado dos microrganismos M-432 e B-SC .....   | 80 |
| Figura 36 - Difração de Raios-X dos microrganismos com a adição do reagente<br>Lactato de Cálcio (5g/l).....                                    | 81 |
| Figura 37 - MEV do precipitado do microorganismo B-414 quando exposto ao<br>reagente Lactato de Cálcio.....                                     | 83 |
| Figura 38 - Imagem de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) do<br>microorganismo B-414 na presença de Lactato de Cálcio .....              | 84 |

|   |    |
|---|----|
| Figura 39 - Leitura da Absorbância (ABS) dos microorganismo na presença do meio de cultura Caldo Nutriente com adição de Nitrato de Cálcio .. | 85 |
| Figura 40 - Difração de Raios-X dos microrganismos com a adição do reagente Nitrato de Cálcio (5g/l).....                                     | 86 |
| Figura 41 - MEV do precipitado do microorganismo B-414 quando exposto ao reagente Nitrato de Cálcio .....                                     | 87 |
| Figura 42 - Imagem de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) do microorganismo B-414 na presença de Nitrato de Cálcio .....               | 87 |
| Figura 43 - Leitura da Absorbância (ABS) dos microorganismo na presença do meio de cultura Caldo Nutriente com adição de Acetato de Cálcio .  | 88 |
| Figura 44 - Coleta do material precipitado. Microrganismos M-23 e B-414 (material insuficiente) .....   | 88 |
| Figura 45 - Difração de Raios-X dos microrganismos com a adição do reagente Acetato de Cálcio (5g/l) .....                                    | 89 |
| Figura 46 - MEV do precipitado do microorganismo B-422 quando exposto ao reagente Acetato de Cálcio .....                                     | 90 |
| Figura 47 - Imagem de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) do microorganismo B-422 na presença de Acetato de Cálcio.....                | 90 |
| Figura 48 - Leitura da Absorbância (ABS) dos microorganismo na presença do meio de cultura Caldo Nutriente com adição de Cloreto de Cálcio .  | 91 |
| Figura 49 - Difração de Raio-X dos microrganismos com a adição do reagente Cloreto de Cálcio (5g/l).....                                      | 92 |
| Figura 50 - MEV dos precipitados dos microrganismos B-422 (A e B), M-12 (C) e M-23 (D) quando exposto ao reagente Cloreto de Cálcio .....     | 93 |



|  |     |
|--|-----|
| Figura 51 - Imagem de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) do microrganismo marinho M-21 na presença de Cloreto de Cálcio .... | 94  |
| Figura 52 - Crescimento dos microrganismos submetidos a diferentes pH's.....   | 95  |
| Figura 53 - Amostras de referência para o experimento dos meios de cultura com diferentes pH's.....                                  | 97  |
| Figura 54 - Amostras contendo o microrganismo <i>Lysinibacillus sphaericus</i> (B-422) após incubação de 24 horas a 30°C .....       | 97  |
| Figura 55 - Gráficos dos crescimentos do microrganismos em função do pH da amostra .....   | 98  |
| Figura 56 - Referência (Placa sem adição de microrganismo).....  | 99  |
| Figura 57 - Precipitado do microrganismo M-12, pH 12. ....   | 100 |
| Figura 58 - Diluição Seriada: Ágar Nutriente com adição de Lactato de Cálcio (5g/l) .....  | 116 |
| Figura 59 - Diluição Seriada: Ágar Nutriente com adição de Cloreto de Cálcio (5g/l) .....  | 117 |
| Figura 60 - Diluição Seriada: Ágar Nutriente com adição de Nitrato de Cálcio (5g/l) .....  | 118 |
| Figura 61 - Diluição Seriada: Ágar Nutriente com adição de Acetato de Cálcio (5g/l) .....  | 118 |
| Figura 62 - Tubos com ureia a esquerda e ilustração do resultado negativo e positivo a direita.....                                  | 126 |
| Figura 63 - Resultado do teste de urease no microrganismos utilizados neste trabalho .....   | 126 |
| Figura 64 - Leituras Espetrofotômetro (B-414).....   | 128 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 65 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo <i>Bacillus sphaericus</i> INQCS 414 na presença de Nitrato de Cálcio (N414), Lactato de Cálcio (L414) e Cloreto de Cálcio (C414) .....                           | 128 |
| Figura 66 - MEV do B-414 variando o meio de cultura.....   | 129 |
| Figura 67 - Leituras Espectrofotômetro (B-422) .....   | 130 |
| Figura 68 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo <i>Bacillus sphaericus</i> INQCS 422 na presença de Nitrato de Cálcio (N422), Acetato de Cálcio (A422), Lactato de Cálcio (L422) e Cloreto de Cálcio (C422) ..... | 130 |
| Figura 69 - MEV do B-422 variando o meio de cultura.....   | 131 |
| Figura 70 - Leituras Espectrofotômetro (B-423) .....   | 132 |
| Figura 71 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo <i>Bacillus sphaericus</i> INQCS 423 na presença de Nitrato de Cálcio (N423), Acetato de Cálcio (A423), Lactato de Cálcio (L423) e Cloreto de Cálcio (C423) ..... | 132 |
| Figura 72 - MEV do B-423 variando o meio de cultura.....   | 133 |
| Figura 73 - Leituras Espectrofotômetro (B-424) .....   | 134 |
| Figura 74 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo <i>Bacillus sphaericus</i> INQCS 424 na presença de Nitrato de Cálcio (N424), Acetato de Cálcio (A424), Lactato de Cálcio (L424) e Cloreto de Cálcio (C424) ..... | 134 |
| Figura 75 - MEV do B-424 variando o meio de cultura.....   | 135 |
| Figura 76 - Leitura Espectrofotômetro (M-12) .....   | 136 |

|  |     |
|--|-----|
| Figura 77 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo marinho denominado M-12 na presença de Nitrato de Cálcio (N12), Acetato de Cálcio (A12), Lactato de Cálcio (L12) e Cloreto de Cálcio (C12) ..         | 136 |
| Figura 78 - MEV do M-12 variando o meio de cultura .....   | 137 |
| Figura 79 - Leitura Espectrofotômetro (M-21) .....   | 138 |
| Figura 80 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo marinho denominado M-21 na presença de Nitrato de Cálcio (N21), Acetato de Cálcio (A21), Lactato de Cálcio (L21) e Cloreto de Cálcio (C21) ..         | 138 |
| Figura 81 - MEV do M-21 variando o meio de cultura .....   | 139 |
| Figura 82 - Leituras Espectrofotômetro (M-23).....   | 140 |
| Figura 83 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo marinho denominado M-23 na presença de Nitrato de Cálcio (N23), Lactato de Cálcio (L23) e Cloreto de Cálcio (C23).....                                | 140 |
| Figura 84 - MEV do M-23 variando o meio de cultura .....   | 141 |
| Figura 85 - Leitura Espectrofotômetro (M-31) .....   | 142 |
| Figura 86 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo marinho denominado M-31 na presença de Nitrato de Cálcio (N31).....   | 142 |
| Figura 87 - MEV do M-31 variando o meio de cultura .....   | 143 |
| Figura 88 - Leitura Espectrofotômetro (M-432) .....  | 144 |
| Figura 89 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo marinho denominado M-432 na presença de Nitrato de Cálcio (N432), Acetato de Cálcio (A432), Lactato de Cálcio (L432) e Cloreto de Cálcio (C432) ..... | 144 |
| Figura 90 - MEV do M-432 variando o meio de cultura .....  | 145 |

|   |     |
|---|-----|
| Figura 91 - Leitura Espectrofotômetro (B-SC).....   | 146 |
| Figura 92 - <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i> na presença de Nitrato de Cálcio (NCS), Lactato de Cálcio (LSC) e Cloreto de Cálcio (CSC) ..... | 146 |
| Figura 93 - MEV do B-SC variando o meio de cultura.....   | 147 |



## LISTA DE TABELAS

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 1 - Característica de materiais estruturais artificiais e naturais .....                                   | 24  |
| Tabela 2 - Impactos positivos dos microrganismos nas atividades humanas ..  | 29  |
| Tabela 3 - Referências taxonômicas de um <i>Bacillus</i> .....  | 31  |
| Tabela 4 - Alguns trabalhos que utilizam <i>Bacillus</i> como agentes de colmatção<br>.....                       | 32  |
| Tabela 5 - Reagentes à base de Cálcio .....   | 49  |
| Tabela 6 - Origem dos microrganismos .....  | 50  |
| Tabela 7 - Informações fornecidas pela Fiocruz sobre o microrganismos<br><i>Lysinibacillus sphaericus</i> .....   | 52  |
| Tabela 8 - Quantidade das amostras para coleta dos precipitados .....   | 66  |
| Tabela 9 - Contagem: Unidade de Formação de Colônias (UFC/ml) para<br>microrganismo B-422 em Ágar Nutriente ..... | 74  |
| Tabela 10 - Soma dos quadrantes da Câmara de Neubauer e concentração de<br>microrganismos por ml da amostra ..... | 75  |
| Tabela 11 - Compostos identificados do precipitado dos microrganismos (Lactato<br>de Cálcio) .....                | 81  |
| Tabela 12 - Compostos identificados do precipitado dos microrganismos (Cloreto<br>de Cálcio) .....                | 93  |
| Tabela 13 - Dados - Espectrofotômetro (ABS) .....   | 114 |
| Tabela 14 - Teste de Normalidade - Shapiro-Wilk .....   | 114 |
| Tabela 15 - Análise de Variância de Uma Via (One Way Anova) .....   | 115 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 16 - Anova de duas vias (Two Way Anova) entre microrganismo e reagentes .....  | 119 |
| Tabela 17 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - Microrganismos com Caldo Nutriente .....                     | 119 |
| Tabela 18 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - Microrganismos com Caldo Nutriente + Lactato de Cálcio.....  | 120 |
| Tabela 19 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - Microrganismos com Caldo Nutriente + Nitrato de Cálcio.....  | 121 |
| Tabela 20 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - Microrganismos com Caldo Nutriente + Acetato de Cálcio ..... | 123 |
| Tabela 21 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - Microrganismos com Caldo Nutriente + Cloreto de Cálcio.....  | 124 |
| Tabela 22 - Leituras: Espectrofotômetro .....   | 127 |
| Tabela 23 - Compostos identificados do precipitado do Bacillus sphaericus INQCS 414.....  | 128 |
| Tabela 24 - Compostos identificados do precipitado do Bacillus sphaericus INQCS 422.....  | 130 |
| Tabela 25- Compostos identificados do precipitado do Bacillus sphaericus INQCS 423.....   | 132 |
| Tabela 26 - Compostos identificados do precipitado do Bacillus sphaericus INQCS 424.....  | 134 |
| Tabela 27 - Compostos identificados do precipitado do microrganismo marinho M-12 .....  | 136 |
| Tabela 28 - Compostos identificados do precipitado do microrganismo marinho M-21 .....  | 138 |

|  |     |
|--|-----|
| Tabela 29 - Compostos identificados do precipitado do microrganismo marinho<br>M-23 .....                              | 140 |
| Tabela 30 - Compostos identificados do precipitado do microrganismo marinho<br>M-31 .....                              | 142 |
| Tabela 31 - Compostos identificados do precipitado do microrganismo marinho<br>M-432 .....                             | 144 |
| Tabela 32 - Compostos identificados dos precipitados dos microrganismos<br>Bacillus subtilis e Bacillus cereus .....   | 146 |
| Tabela 33 - Leituras de absorvância (ABS) das amostras em meio de cultura com<br>pH 7 .....                            | 148 |
| Tabela 34 - Leituras de absorvância (ABS) das amostras em meio de cultura com<br>pH 9 .....                            | 148 |
| Tabela 35 - Leituras de absorvância (ABS) das amostras em meio de cultura com<br>pH 10 .....                           | 148 |
| Tabela 36 - Leituras de absorvância (ABS) das amostras em meio de cultura com<br>pH 11 .....                           | 149 |
| Tabela 37 - Leituras de absorvância (ABS) das amostras em meio de cultura com<br>pH 12 .....                           | 149 |
| Tabela 38 - Anova de duas vias (Two Way Anova) entre microrganismo e pH<br>.....                                       | 149 |
| Tabela 39 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey -<br>comparação do pH com o microrganismo B-414 ..... | 149 |
| Tabela 40 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey -<br>comparação do pH com o microrganismo B-422 ..... | 150 |

|   |     |
|---|-----|
| Tabela 41 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo B-423 ..... | 150 |
| Tabela 42 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo B-424 ..... | 151 |
| Tabela 43 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo M-12.....   | 151 |
| Tabela 44 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo M-21.....   | 151 |
| Tabela 45 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo M-23.....   | 152 |
| Tabela 46 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo M-31.....   | 152 |
| Tabela 47 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo M-432.....  | 152 |
| Tabela 48 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo B-SC .....  | 153 |
| Tabela 49 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação os microrganismos e o pH 7 .....      | 153 |
| Tabela 50 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação os microrganismos e o pH 9 .....      | 154 |
| Tabela 51 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação os microrganismos e o pH 10 .....     | 155 |
| Tabela 52 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação os microrganismos e o pH 11 .....     | 157 |



|  |     |
|--|-----|
| Tabela 53 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey -<br>comparação os microrganismos e o pH 12 ..... | 158 |
|--|-----|

## SUMÁRIO

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>24</b> |
| 1.1      | OBJETIVOS .....   | 25        |
| 1.1.1    | Objetivo Geral.....   | 25        |
| 1.1.2    | Objetivos específicos.....  | 25        |
| 1.2      | JUSTIFICATIVA .....   | 26        |
| <b>2</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                     | <b>28</b> |
| 2.1      | MICROBIOLOGIA E OS MICRORGANISMOS .....                               | 28        |
| 2.2      | CLASSIFICAÇÃO DOS MATERIAIS AUTOCICATRIZANTES.....                    | 33        |
| 2.3      | AUTOCICATRIZAÇÃO NO CONCRETO .....                                    | 35        |
| 2.3.1    | Difratometria de Raios-X (DRX) .....                                  | 39        |
| 2.3.2    | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....                        | 40        |
| 2.3.3    | Permeabilidade.....   | 42        |
| 2.3.4    | Resistência Mecânica.....   | 43        |
| 2.4      | MECANISMO DE AUTOCICATRIZAÇÃO EM MATERIAIS DE BASE<br>CIMENTÍCIA..... | 45        |
| <b>3</b> | <b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>                                      | <b>47</b> |
| 3.1      | MATERIAIS .....   | 48        |
| 3.1.1    | Água Destilada .....  | 48        |
| 3.1.2    | Caldo Nutriente e Ágar Nutriente.....                                 | 48        |
| 3.1.3    | Reagentes à base de Cálcio.....                                       | 49        |
| 3.1.4    | Microrganismos .....  | 50        |
| 3.1.4.1  | <i>Bacillus megaterium</i> .....                                      | 51        |
| 3.1.4.2  | <i>Lysinibacillus sphaericus (Bacillus sphaericus)</i> .....          | 52        |
| 3.1.4.3  | <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Bacillus cereus</i> .....               | 53        |
| 3.1.4.4  | <i>Microrganismos de vida marinha</i> .....                           | 53        |
| 3.2      | MÉTODOS .....   | 54        |
| 3.2.1    | Crescimento microbiano .....  | 54        |
| 3.2.2    | Inoculação .....  | 55        |
| 3.2.3    | Renovação das culturas bacterianas.....                               | 57        |
| 3.2.4    | Métodos de contagem - a quantificação do crescimento microbiano       | 59        |

|          |  |            |
|----------|--|------------|
| 3.2.4.1  | <i>Leitura da densidade óptica por Espectrofotometria .....</i>  | 59         |
| 3.2.4.2  | <i>Contagem em placas de Petri - Método de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).....</i>        | 62         |
| 3.2.4.3  | <i>Contagem celular em Câmara de Neubauer .....</i>  | 64         |
| 3.2.5    | Método de coleta do precipitado dos microrganismos.....  | 66         |
| 3.2.6    | Difratometria de Raios-X (DRX) .....   | 68         |
| 3.2.7    | Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....                  | 69         |
| 3.2.8    | Crescimento dos microrganismos no pH alcalino.....   | 69         |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>   | <b>71</b>  |
| 4.1      | CLASSIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS .....   | 71         |
| 4.2      | CONTAGEM MICROBIANA .....  | 72         |
| 4.2.1    | Diluição seriada - Contagem em placas (UFC/ml).....  | 72         |
| 4.2.2    | Câmara de Neubauer .....   | 75         |
| 4.3      | ANÁLISE POR GRUPO DE REAGENTES.....  | 77         |
| 4.3.1    | Caldo Nutriente.....   | 78         |
| 4.3.2    | Caldo Nutriente + Lactato de Cálcio .....  | 79         |
| 4.3.3    | Caldo Nutriente + Nitrato de Cálcio .....  | 85         |
| 4.3.4    | Caldo Nutriente + Acetato de Cálcio.....   | 88         |
| 4.3.5    | Caldo Nutriente + Cloreto de Cálcio .....  | 91         |
| 4.4      | RESULTADO DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM DIFERENTES PH'S .....   | 95         |
| 4.5      | FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS NESTE TRABALHO .....  | 101        |
| <b>5</b> | <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>  | <b>103</b> |
| 5.1      | CONCLUSÕES .....   | 103        |
| 5.2      | SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....  | 105        |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>  | <b>107</b> |
|          | <b>APÊNDICE I - DADOS PARA ESCOLHA DOS 10 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS.....</b>                | <b>114</b> |
|          | <b>APÊNDICE II - PLACAS DE PETRI - DILUIÇÃO SERIADA .....</b>  | <b>116</b> |
|          | <b>APÊNDICE III - COMPARAÇÃO ENTRE MICRORGANISMOS E REAGENTES (ANOVA DE DUAS VIAS E TESTE DE TUKEY).....</b> | <b>119</b> |

|  |     |
|--|-----|
| APÊNDICE IV - TESTE DE HIDRÓLISE DA UREIA .....  | 126 |
| APÊNDICE V - LEITURAS (ESPECTROFOTÔMETRO) E<br>ESTATÍSTICAS (TESTE DE NORMALIDADE, ANÁLISE DE<br>VARIÂNCIA E TESTE DE TUKEY) .....                             | 127 |
| APÊNDICE VI - DADOS DAS ANÁLISES INDIVIDUAIS DE CADA<br>MICRORGANISMO (ESPECTROFOTÔMETRO, DRX E MEV) .....   | 128 |
| APÊNDICE VII - LEITURAS (ABSORBÂNCIA POR<br>ESPECTROFOTÔMETRO) E ESTATÍSTICA DO CRESCIMENTO<br>DOS MICRORGANISMOS QUANDO SUBMETIDOS A DIFERENTES<br>PH'S ..... | 148 |

## 1 INTRODUÇÃO

De acordo com a publicação de revisão de Van Tittelboom & De Belie (2013), um dos primeiros trabalhos abordando materiais autocicatrizantes não foram sobre materiais de base cimentícia, e sim sobre materiais poliméricos, como retrata o trabalho de Malinskii et al. (1969). No ano de 1969 houve a primeira patente de um polímero com características de autocicatrização, do trabalho de Craven (1966). Alguns anos depois, foram publicados mais dois importantes trabalhos, o de Wool (1980) e o de Wool & O'Connor (1981), ambos sobre autocicatrização de materiais poliméricos termoplásticos. Porém naquela época não houve grande interesse da comunidade científica e o tema ficou adormecido. Então, nos anos 90, com os trabalhos de Dry (1994) com concreto autocicatrizante e Dry (1996) com polímeros, o tema voltou a surgir com força maior na comunidade científica. O tema despertou de vez o interesse quando os pesquisadores White et al. (2001) publicaram na revista *Nature* um trabalho sobre fibras ocas preenchidas com adesivo líquido para autocicatrização em compostos poliméricos (GHOSH, 2009; VAN TITTELBOOM; DE BELIE, 2013; ZWAAG, 2007).

Os materiais autocicatrizantes podem ser definidos como os que possuem a habilidade de se auto reparar sem intervenção externa (GHOSH, 2009; SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016). De acordo com Zwaag (2007), um objetivo recorrente do desenvolvimento dos materiais autocicatrizantes foi o de imitar os materiais da natureza. A Tabela 1 apresenta uma comparação das características de materiais estruturais artificiais e materiais estruturais naturais.

Tabela 1 - Característica de materiais estruturais artificiais e naturais

| <b>Materiais Estruturais Artificiais</b>                   | <b>Materiais Estruturais Naturais</b>               |
|--|---|
| Baseado em muitos elementos da tabela periódica            | Baseado em poucos elementos (C, N, O, Ca, Si, etc.) |
| Processo termoquímico (altas temperaturas)                 | Processado em temperatura ambiente                  |
| Alta taxa de produção                                      | Baixa taxa de crescimento                           |
| Composto monolítico ou estrutura interna simples           | Complexo, estrutura hierárquica                     |
| Não é possível efetuar alterações internas após fabricação | Renovação contínua                                  |
| Nenhuma capacidade de adaptação às mudanças do ambiente    | Capacidade de adaptação a um ambiente em evolução   |
| Sem capacidade, no geral, de se auto reparar               | Capacidade de sentir o dano e se auto reparar       |

Fonte: ZWAAG (2007)

Duas aplicações recentes, em 2014, do concreto autocicatrizante no Brasil foram na laje de subpressão do Museu da Imagem e do Som (MIS) e na obra da cobertura do Museu de Arte do Rio (MAR), ambas na cidade do Rio de Janeiro. Nessas obras foram utilizados cimentos de escória de alto forno ativados por catalizadores cristalinos. Nessa aplicação, os autores notaram melhoras significativas nas propriedades mecânicas e redução na permeabilidade do concreto (TAKAGI; LIMA; HELENE, 2016).

Zwaag (2007) rotula seis atributos que um material autocicatrizante deve ter como característica em serviço:

- 1º. Pervasividade: o material tem que estar pronto para ativação quando e onde for necessário, ou seja, nas microfissuras quando ocorrerem;
- 2º. Estabilidade: permanecer ativo durante sua vida útil, que pode levar décadas;
- 3º. Economia: economicamente viável para utilização em grande escala;
- 4º. Confiabilidade: o mecanismo de autocicatrização deve funcionar quando for solicitado;
- 5º. Qualidade: as propriedades do material devem ser recuperadas;
- 6º. Repetibilidade: capacidade de autocicatrização em eventos de danos múltiplos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método de hierarquização capaz de selecionar em um conjunto de microrganismos quaisquer os passíveis de serem aplicados em estruturas de base cimentícia projetando a sua autocicatrização.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Quantificar os microrganismos através do seu crescimento em diferentes meios de culturas;
- Classificar o crescimento microbiano em meio de diferentes pH's;
- Verificar a precipitação do composto químico carbonato de cálcio;

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Em todas as estruturas de concreto as microfissuras estão sujeitas a ocorrerem por diversos motivos, e as consequências das mesmas podem levar as estruturas a uma redução do tempo de vida útil (CHAHAL; SIDDIQUE; RAJOR, 2012; JONKERS, 2011; VAN TITTELBOOM et al., 2010). Essas danificações nas estruturas de concreto podem impactar em seu custo ao longo do tempo, haja vista que serão necessárias intervenções para o tratamento destes danos, fato que possivelmente irá gerar custos de mão de obra para manutenção e prejuízos se a edificação tiver que ser isolada para execução do reparo. Se for considerada as aplicações em áreas industriais com alta agressividade, isso se torna ainda mais complexo e crítico.

O concreto é um material ainda com grande utilização no mundo apesar de que no Brasil as vendas de cimento no ano de 2018 fecharam com queda de 1,2% em comparação ao ano de 2017, mesmo vendendo um total de aproximadamente 52,7 milhões de toneladas de acordo com o Sindicato Nacional da Indústria do Cimento (SNIC)<sup>1</sup>, houve queda. Mesmo com essa redução nas vendas o concreto ainda é um dos materiais mais utilizados no Brasil e no mundo na construção civil, o que por si só já justifica o estudo e aprimoramento dos conhecimentos das técnicas de autocicatrização

Todo tipo de material que sua matéria prima se origina da natureza será responsável por alguma porcentagem da poluição ou degradação da natureza, e para o cimento que se origina dos produtos da calcinação de calcário e argila em fornos que chegam até aproximadamente a 1450°C não é diferente. De acordo com o Presidente da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP<sup>2</sup>), na conferência de abertura do 7º Congresso Brasileiro de Cimento (José Goldemberg, em 2016), para cada tonelada de cimento produzida no Brasil são emitidos 600 kg de CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) para a atmosfera,

---

<sup>1</sup>Sindicato Nacional da Indústria do Cimento: <http://snic.org.br/index.php> (último acesso: dia 17/03/2019)

<sup>2</sup>Agência FAPESP: <http://agencia.fapesp.br/especialistas-discutem-papel-da-industria-do-cimento-nas-emissoes-de-co2/23449/> (último acesso: 17/03/2019)

número que está abaixo em 300 kg da média mundial que é de 900 kg de CO<sub>2</sub> emitidos para a atmosfera. No trabalho de Worrell et al. (2001) é citado que cerca de 7% do CO<sub>2</sub> lançado na atmosfera é devido à produção do cimento. A participação das indústrias cimenteiras no Brasil contribui com 2,6% da emissão total de CO<sub>2</sub> no país, número que representa aproximadamente a metade da média mundial (FAPESP, 2016).

Os mecanismos de autocicatrização podem contribuir para uma maior vida de serviço da estrutura e ainda fazer o concreto não somente mais durável, mas também mais econômico ao longo de sua vida útil. A ideia desta pesquisa em autocicatrização não é implantar uma filosofia de que as emissões de dióxidos de carbono serão reduzidas, mas sim implantar a ideia de preservação das estruturas, através da manutenção com menos necessidade de intervenção externa. Ou seja, buscando reduzir indiretamente o uso de materiais cimentícios que iriam ser utilizados na manutenção.

Todo ano são gastos enormes montantes de dinheiro público e privado em reparos de estruturas cimentícias (CAILLEUX; POLLET, 2009). De acordo com Silva et al. (2015), o custo direto de reparo e manutenção de fissuras foi estimado em U\$ 147/m<sup>3</sup> de concreto, valor considerável que poderia ser empregado em outros projetos. Isso mostra o quanto é importante intervir com algum modo de prevenção para que esses danos não ocorram (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016).

Siddique e Chahal (2011) investigaram a precipitação de microrganismos no fechamento dos poros em elementos de concreto, além disso eles mostraram diversos estudos da utilização de bactérias para a remoção química de agentes agressivos ao ambiente, por exemplo, a remoção química de resíduos contaminantes em córregos, biorremediação de contaminantes no solo e a remoção de gases estufas em aterros sanitários. Esses exemplos mostram que estas bactérias também podem ser utilizadas em sistema diretos para proteção do ambiente, mais um fato que justifica a importância desta pesquisa.

A importância deste estudo é mostrar que existem meios sustentáveis de se reparar uma estrutura através de uma abordagem biológica utilizando microrganismos.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Todo produto que é adicionado a uma estrutura de base cimentícia deve ser conhecido, seja em sua estrutura física ou composição química ou bem como no desempenho que ele contribuirá à estrutura em serviço. Como o objeto de adição serão microrganismos, existe a necessidade de entender melhor o comportamento dos mesmos e dominar técnicas de microbiologia para que o trabalho seja executado sem contaminações e segurança à saúde.

### 2.1 MICROBIOLOGIA E OS MICRORGANISMOS

A microbiologia é a ciência que estuda os microrganismos, estes são seres vivos minúsculos e impossíveis de serem vistos sem o auxílio de um equipamento quando isolados (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Eles podem ser encontrados como células únicas ou em agrupamentos celulares. Os microrganismos são células de vida livre, ou seja, uma única célula microbiana pode ter existência independente, diferente das células animais ou vegetais que são seres multicelulares (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

Os micróbios são extremamente relevantes para a vida terrestre, a maioria dos microrganismos contribuem para o equilíbrio entre os organismos vivos e os compostos químicos do ambiente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Nesse contexto, vale lembrar que as cianobactérias (grupo de bactérias que obtêm energia por fotossíntese) foram provavelmente os primeiros produtores de matéria orgânica a liberarem oxigênio na Terra (AZEVEDO, 1998).

Hoje se sabe da importância e do impacto que os microrganismos causam, sendo em sua maioria benéfica para os seres humanos, plantas e animais. Alguns dos principais benefícios dos microrganismos são apresentados na Tabela 2.

A descoberta das bactérias ocorreu no ano de 1684 com as observações de Antoni van Leeuwenhoek, que foi um dos cientistas que contribuíram para o melhoramento do microscópio (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Quando não era conhecida a existência dos micróbios, existiam somente duas classificações: ou era agrupado no reino animal ou no reino vegetal. Após a descoberta dos microrganismos foi necessária uma nova classificação. Em

1978, Carl Woese organizou um novo sistema de classificação em três domínios baseadas em suas paredes celulares: Bactéria (as paredes celulares contêm peptideoglicanos<sup>3</sup>), Archaea (as paredes celulares, quando presentes não contêm peptideoglicanos) e Eucarya (Protista, Fungi, Plantae e Animalia) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Tabela 2 - Impactos positivos dos microrganismos nas atividades humanas

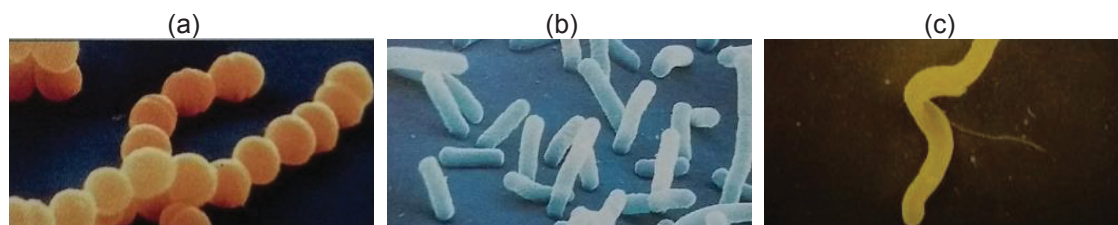
| <b>Atuação</b>        | <b>Impacto</b>  |
|-----------------------|---|
| Agricultura           | Leguminosas - formação de nódulos em suas raízes, onde os mesmos podem ser utilizados pelas plantas para seu crescimento.<br>Redução de agrotóxicos<br>Controle de pragas. Ex: <i>Bacillus thuringiensis</i> , bactéria utilizada pelos EUA para controlar pragas, como: o lagarto da alfafa, pestes do milho, vermes do repolho. |
| Agropecuária          | Rúmen - microrganismos que atuam nos processos digestivos dos bovinos.  |
| Reciclagem            | Reciclagem dos elementos vitais (carbono, nitrogênio, enxofre, oxigênio e fósforo), conversão dos elementos essenciais para a vida. Decomposição de detritos orgânicos.   |
| Tratamento de esgoto  | Tratamento com a ação de micróbios benéficos. Conversão de matéria orgânica em produtos secundários, como nitratos, fosfatos e etc.   |
| Biorremediação        | Limpeza de poluentes do ambiente. As toxinas podem ser removidas do ambiente através dos microrganismos.  |
| Biotecnologia         | Utilização comercial de microrganismos para produção de produtos químicos.  |
| Engenharia genética   | Tecnologia do DNA recombinante com o objetivo de desenvolver o potencial dos microrganismos.  |
| Indústria alimentícia | Conservação dos alimentos. Enlatados. Tratamentos por irradiação. Ex: Laticínios, Pães, Cerveja, Vinhos e etc.  |

Fonte: O Autor

As bactérias são seres unicelulares procariontes, que significa que o seu material genético não está envolvido por uma membrana nuclear especial (SIDDIQUE; CHAHAL, 2011). Em relação ao seu formato, as formas mais comuns são os cocos (forma esférica), os bacilos (forma de bastão) e os espirilos (curvada), como ilustra na Figura 1.

<sup>3</sup> Peptideoglicanos são as estruturas que conferem resistência à parede celular do microrganismo, no geral possuem cadeias lineares de resíduos de açúcares chamada de glicanos.

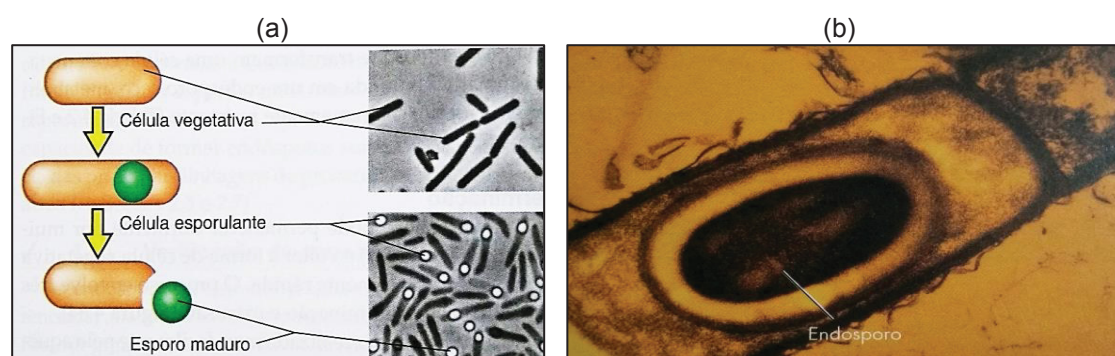
Figura 1 - Formas comuns das Bactérias: (a) cocos - estreptococos. (b) bacilos - bacilo isolado. (c) espirais - espirilos. Imagens de microscopia eletrônica de varredura - magnitude  $2\mu\text{m}$



Fonte: Adaptado de TORTORA, FUNKE e CASE (2005).

Uma importante característica dos microrganismos é a capacidade de formar endósporo, ou simplesmente esporos. O processo chamado esporulação ocorre quando os nutrientes básicos se esgotam, ou quando o microrganismo é submetido a um ambiente agressivo que ameaça a sua sobrevivência, como: baixas e altas temperaturas, diferente pH de seu meio natural, produtos químicos, falta de água e etc. Assim, os esporos se diferem das células por apresentarem grande resistência a essas condições extremas, como observado na Figura 2 (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Figura 2 - Formação dos esporos: (a) formação do endósporo por esporulação, fase de células de *Clostridium pascui*. (b) endósporo de *Bacillus anthracis*, MET-1 $\mu\text{m}$



Fonte: (a) MADIGAN, MARTINKO e PARKER (2004). (b) TORTORA, FUNKE e CASE (2005)

Os esporos podem sobreviver por muitos anos e voltar a sua forma ativa bem rápido. Um exemplo que evidenciou isso foi a manipulação, em 1981 de uma suspensão de endósporos da bactéria *Clostridium acetivum* preparada em 1947. Passados 34 anos, a suspensão foi inoculada em meio nutriente e em

menos de 12 horas já houve crescimento celular (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004).

A ativação do esporo ocorre quando há nutriente e a temperatura esteja mais elevada (não letal). Esta forma de microrganismo é utilizada para a aplicação em concretos para a obtenção da cicatrização. Jonkers & Schlangen (2007) induziram a esporulação utilizando um meio mineral com pH médio de 9,2. Eles utilizaram quatro microrganismos, *Bacillus cohnii*, *Bacillus halodurans*, *Bacillus pseudofirmus* e *Sporosarcina pasteurii*. Somente a última não formou esporos, fato que já era previsto, pois as bactérias que comumente formam esporos são as do gênero *Bacillus* e do gênero *Clostridium*.

A denominação *Bacillus* faz parte de sua hierarquia taxonômica, logo, a classificação é dada como: Domínio, Filo, Classe, Ordem, Família, Gênero e Espécie, ou seja, um *Bacillus* é um Gênero que contém diversas espécies. Na Tabela 3 segue a divisão taxonômica de uma bactéria do Gênero *Bacillus*.

Tabela 3 - Referências taxonômicas de um *Bacillus*

| Divisão taxonômica | Nome                          |
|--------------------|-------------------------------|
| Domínio            | Bactéria                      |
| Filo               | Firmicutes                    |
| Classe             | Bacilli                       |
| Ordem              | Bacillales                    |
| Família            | Bacillaceae                   |
| Gênero             | <b><i>Bacillus</i></b>        |
| Espécie            | Ex: subtilis; cereus; cohnii; |

Fonte: Adaptado de MADIGAN, MARTINKO e PARKER (2004)

Como foi apresentado na Tabela 2, os microrganismos estão sendo utilizados nas mais diversas áreas. Atualmente, há diversos estudos em vários centros de pesquisas ao redor do mundo no desenvolvimento de concretos autocicatrizantes usando bactérias. Dois grandes centros de pesquisa nesta área são o Magnel Laboratório para Pesquisas de Concreto do Departamento de Engenharia Estrutural da Universidade de Ghent na Bélgica e o Departamento de Materiais e Ambiente da Faculdade de Engenharia e Geociência da Universidade de Tecnologia de Delft na Holanda. Grande parte das publicações desta área de estudo tem relação com estas instituições.

Na Tabela 4 estão apresentados alguns *Bacillus* que estão sendo utilizados nas pesquisas de concretos autocicatrizantes, indicando o tipo de mecanismo de precipitação, o nutriente que foi utilizado para o seu crescimento e a forma de aplicação do mesmo nas estruturas cimentícias.

Tabela 4 - Alguns trabalhos que utilizam *Bacillus* como agentes de colmatção

(continua)

| <b>Mecanismo de precipitação</b> | <b>Microrganismo</b>          | <b>Aplicação</b>  | <b>Nutriente</b>  | <b>Autor</b>                          |
|----------------------------------|-------------------------------|---|---|---------------------------------------|
| Ureolítico                       | <i>Bacillus sphaericus</i>    | Adição de tubos com bactérias                                 | Ureia, extrato de levedura  | (WANG et al., 2010)                   |
| Ureolítico                       | <i>Bacillus sphaericus</i>    | Adição de microcápsulas                                       | Ureia, meio basal salino (KALFON; BARJAC, 1983)                                     | (WANG et al., 2014)                   |
| Ureolítico                       | <i>Bacillus sphaericus</i>    | Adição de tubos com bactérias e outros agentes                | Ureia, extrato de levedura  | (WANG et al., 2012)                   |
| Ureolítico                       | <i>Bacillus sphaericus</i>    | Imersão da amostra em meio bacteriano em diferentes situações | Ureia, soluções de cálcio   | (VAN TITTELBOOM et al., 2010)         |
| Ureolítico                       | <i>Bacillus sphaericus</i>    | Imersão em meio bacteriano                                    | Ureia, caldo nutriente, bicarbonato de sódio e cloreto de amônio                    | (DE MUYNCK et al., 2008a)             |
| Ureolítico                       | <i>Bacillus sphaericus</i>    | Tratamento de superfície                                      | Ureia, caldo nutriente  | (DE MUYNCK et al., 2008b)             |
| Ureolítico                       | <i>Sporosarcina pasteurii</i> | Aplicação: Fechar canal de lixiviação em solo arenoso.        | Ureia, caldo nutriente, cloreto de amônio, bicarbonato de sódio e cloreto de cálcio | (GOLLAPUDI et al., 1995)              |
| Ureolítico                       | <i>Sporosarcina pasteurii</i> | Tratamento de superfície                                      | Ureia, caldo nutriente  | (SIDDIQUE; CHAHAL, 2011)              |
| Ureolítico                       | <i>Sporosarcina pasteurii</i> | -   | Ureia, caldo nutriente, cloreto de amônio e bicarbonato de sódio                    | (STOCKS-FISCHER; GALINAT; BANG, 1999) |
| Ureolítico                       | <i>Sporosarcina pasteurii</i> | Adição na mistura da pasta cimentícia                         | Ureia, ácido glutâmico, TSA, extrato de levedura, sulfato de amônio e tricina       | (BANG; GALINAT; RAMAKRISHNAN, 2001)   |
| Ureolítico                       | <i>Sporosarcina pasteurii</i> | Adição na mistura da pasta cimentícia                         | Ureia, fosfato  | (RAMAKRISHNAN; PANCHALAN; BANG, 2005) |

Tabela 4 - Alguns trabalhos que utilizam *Bacillus* como agentes de colmatção

(continuação)

|  |                               |                                       |  |  |
|--|-------------------------------|---------------------------------------|--|--|
| Ureolítico                             | <i>Bacillus cereus</i>        | Adição na mistura da pasta cimentícia | Ureia, fosfato e cloreto de cálcio                                   | (MAHESWARAN et al., 2016)                  |
|  | <i>Sporosarcina pasteurii</i> |                                       |  |  |
| Conversão metabólica de ácido orgânico | <i>Bacillus cohnii</i>        | Adição de microcápsulas               | Lactato de cálcio, extrato de levedura                               | (ZHANG et al., 2017)                       |
| Conversão metabólica de ácido orgânico | <i>Bacillus cohnii</i>        | Adição das bactérias em agregado leve | Lactato de cálcio, extrato de levedura                               | (SIERRA-BELTRAN; JONKERS; SCHLANGEN, 2014) |
| Conversão metabólica de ácido orgânico | <i>Bacillus cohnii</i>        | Adição na mistura da pasta cimentícia | Lactato de cálcio, extrato de levedura                               | (JONKERS; THIJSSSEN, 2010)                 |
| Conversão metabólica de ácido orgânico | <i>Bacillus cohnii</i>        | Adição na mistura da pasta cimentícia | Peptona, extrato de carne, bicarbonato de sódio e carbonato de sódio | (JONKERS et al., 2010)                     |
|  | <i>Bacillus pseudofirmus</i>  |                                       |  |  |
|  | <i>Bacillus cohnii</i>        |                                       |  |  |
| Conversão metabólica de ácido orgânico | <i>Bacillus halodurans</i>    | Adição na mistura da pasta cimentícia | Peptona, extrato de carne - caldo nutriente                          | (JONKERS; SCHLANGEN, 2007)                 |
|  | <i>Bacillus pseudofirmus</i>  |                                       |  |  |
| Conversão metabólica de ácido orgânico | <i>Bacillus subtilis</i>      | Adição na mistura da pasta cimentícia | Lactato de cálcio  | (KHALIQ; EHSAN, 2016)                      |

Fonte: OLIVEIRA et al. (2018)

Não são somente as bactérias do gênero *Bacillus* que estão sendo utilizadas para induzir a autocicatrização, os gêneros *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Sporosarcina*, *Lysinibacillus*, *Diaphorobacter* (SEIFAN; SAMANI; BERENJIAN, 2016) também têm a capacidade de atuar como microrganismos autocicatrizantes.

## 2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS MATERIAIS AUTOCICATRIZANTES

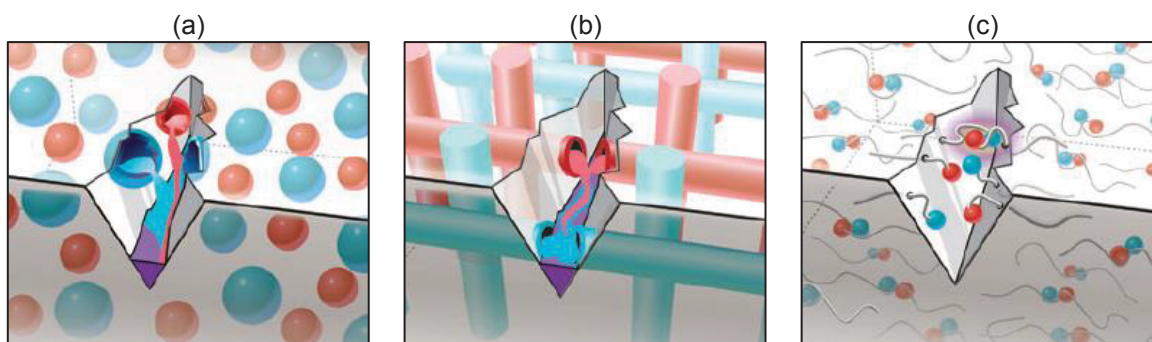
Há duas diferentes abordagens para a autocicatrização em materiais cimentícios: autocicatrização autógena (que é a autocicatrização intrínseca) e a autocicatrização autônoma (baseada em alguma adição externa para a obtenção da autocicatrização do material) (BLAISZIK et al., 2010; VAN TITTELBOOM; DE BELIE, 2013). De outra maneira, Talaiekhazan et al. (2014) defendem três divisões taxonômicas: autocicatrização natural (intrínseca), autocicatrização



química (pela adição de microcápsulas) e autocicatrização biológica (utilização de microrganismos para processo de colmatagem das microfissuras).

De acordo com Blaiszik et al. (2010), os materiais autocicatrizantes podem ser classificados em três grupos, o primeiro pela aplicação de cápsulas embebidas com agentes cicatrizantes, o segundo por tubos embebidos com agentes cicatrizantes e o terceiro a cicatrização intrínseca propriamente dita, Figura 3. O primeiro e segundo grupo são nomeados como autocicatrização autônoma, e o terceiro é nomeado como autocicatrização autógena (VAN TITTELBOOM; DE BELIE, 2013). Blaiszik et al. (2010) trabalharam com polímeros, e nessa classificação não foi considerada onde estaria a autocicatrização por microrganismos.

Figura 3 - Tipos de autocicatrização. (a) cápsulas. (b) tubos. (c) intrínseca



Fonte: Adaptado de BLAISZIK et al. (2010)

A autocicatrização natural (intrínseca) é um processo autógeno e os seus principais métodos de atuação são pelos bloqueios das microfissuras pela expansão dos produtos de hidratação da matriz cimentícia e pelos processos de reações de hidratação tardias dos cimentos que ainda não reagiram (BLAISZIK et al., 2010; TALAIEKHOZAN et al., 2014; VAN TITTELBOOM; DE BELIE, 2013). A autocicatrização química se refere a aplicação de cápsulas, tubos ou injeção de compostos na estrutura (TALAIEKHOZAN et al., 2014).

O processo de autocicatrização biológica é o que utiliza de microrganismos para desencadear um processo de autocicatrização caso ocorram fissuras no elemento que recebe este tipo de adição. Os micróbios mais

utilizados para este processo são estirpes<sup>4</sup> de bactérias preparadas em laboratório, no qual elas podem ser adicionadas por diferentes métodos, como: por adição do caldo microbiano diretamente ao concreto fresco, adições na forma de esporos microbianos, na forma imobilizada em gel de sílica e carbono ativado (TALAIEKHOZAN et al., 2014; WANG et al., 2012; WU; JOHANNESSON; GEIKER, 2012).

Essas classificações são importantes para ordenar, agrupar técnicas semelhantes e facilitar a identificação do tipo de aplicação e autocicatrização que podem ocorrer nos elementos que recebem adições com características autocicatrizantes.

### 2.3 AUTOCICATRIZAÇÃO NO CONCRETO

Devido a múltiplas razões, as estruturas de concreto armado podem conter microfissuras, microfissuras e vazios descontínuos. Através destes vazios formados podem ocorrer infiltrações que contribuem para perdas de durabilidade, sejam por ataques físicos ou químicos. Sendo assim, os elementos de concreto estão sujeitos a perdas graduais de estanqueidade, principalmente quando há a interconexão dessas fissuras (HOLA; KSIAZEK, 2009; NEWMAN; CHOO, 2003). De acordo com a ACI Committee 201.2R-01 (2008), a durabilidade do concreto de cimento hidráulico pode ser definida como a habilidade de resistir às ações das intempéries, ataques químicos, abrasão e outros processos de deterioração. Em linhas gerais, mesmo que um concreto seja cuidadosamente dosado, é necessário que se tenha consciência de sua durabilidade e suas limitações de serviço, para que não ocorram casos de degradação prematura em uma estrutura (AGUIAR; CAMÕES; MOREIRA, 2008).

Pensando na durabilidade das estruturas de concreto e no quanto poderá ser economizado em capital econômico nas manutenções, Jonkers &

---

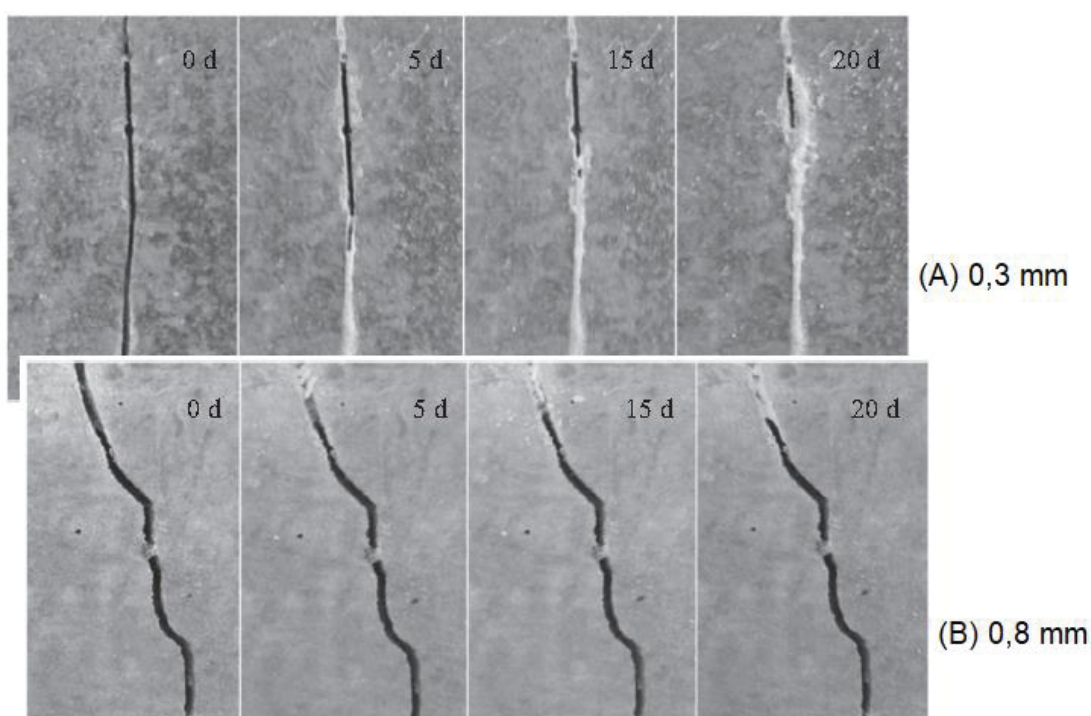
<sup>4</sup> Estirpe ou cepa se refere a um grupo de descendentes que compartilham semelhanças morfológicas ou fisiológicas. (Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Estirpe> - último acesso 23/04/2019)



Schlangen (2007) sugerem que a pesquisa do concreto autocicatrizante tem potencial para gerar resultados satisfatórios, no sentido de economia a longo prazo e em manutenções de maneira prática e sustentável.

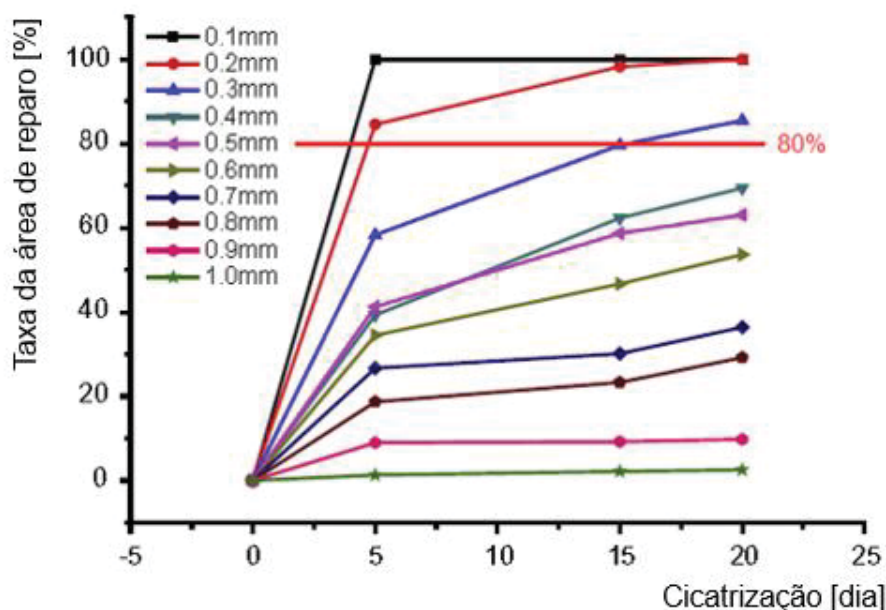
Luo et al. (2015) utilizaram para a autocicatrização de uma viga microrganismos na forma de esporos, porém eles não especificam quais micróbios foram utilizados no processo. A Figura 4 mostra as superfícies fissuradas das vigas, onde se observa que na imagem apresentam apenas duas dimensões de fissuras, (A) com 0,3 mm e (B) com 0,8 mm. Porém, no trabalho foram analisadas fissuras nas dimensões de 0,1 mm a 1,0 mm variando de 0,1 em 0,1 mm. Nota-se que, tanto pela Figura 4 como pela Figura 5, houve maior eficiência no fechamento das fissuras com menores dimensões. Para o fechamento das fissuras em 80% de área superficial de reparo ou acima, em aberturas de até 0,3 mm, foram necessários apenas 15 dias de cicatrização.

Figura 4 - Imagem da superfície da viga fissurada. (A) viga com fissuras de 0,3mm. (B) viga com fissuras de 0,8mm



Fonte: Adaptado de LUO, QIAN e LI (2015)

Figura 5 - Diferentes dimensões de fissuras, de 0,1 mm a 1,0 mm (gráfico da taxa de porcentagem de área reparada (%) x autocicatrização / dia)



Fonte: Adaptado de LUO, QIAN e LI (2015)

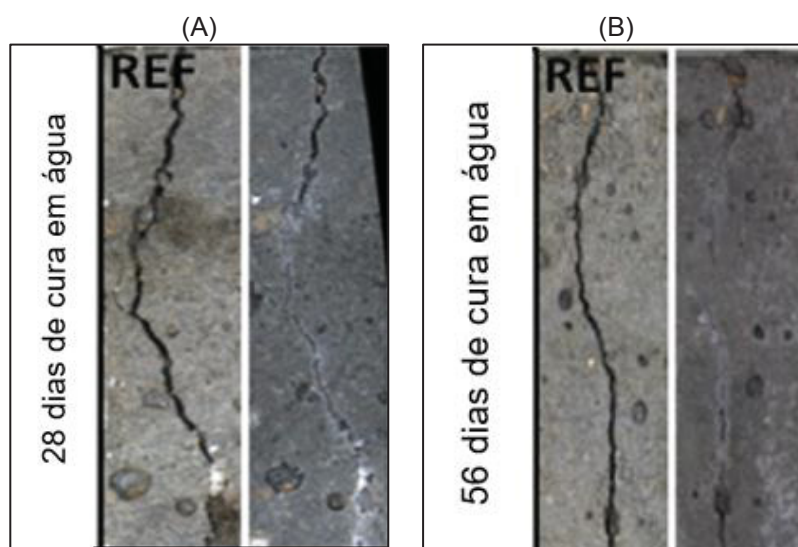
A atividade de precipitação dessas bactérias garante que o processo de colmatção por carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) seja atingido ocasionando o fechamento das microfissuras. Diversos trabalhos (DE MUYNCK et al., 2008; DE MUYNCK; DE BELIE; VERSTRAETE, 2010; WANG et al., 2014; VAN TITTELBOOM et al., 2010) mostraram os mecanismos destas reações bioquímicas de precipitação, nas quais todas as demonstrações obtêm o mesmo produto final da reação global, o composto cristalino de carbonato de cálcio.

Da Silva et al. (2015) trabalharam com cubos armados de 40 x 40 x 40 cm para a avaliação da autocicatrização. Nesse trabalho foi utilizada a bactéria *Bacillus sphaericus* como agente de cicatrização, com a qual foi obtida precipitação de carbonato de cálcio pela hidrólise da ureia.

A hidrólise da ureia é feita por uma enzima chamada urease. Muitas enzimas têm sido nomeadas pela adição do sufixo “ase” ao nome de seu substrato, ou à palavra ou frase que descreve a sua atividade. Assim, a urease catalisa a hidrólise da ureia. A urease enzimática é comum em muitos microrganismos e pode ser reproduzida em laboratório (SIDDIQUE; CHAHAL, 2011). O completo mecanismo das reações bioquímicas pode ser visto no item 2.3.2, mecanismos de autocicatrização.

Além dos processos de aplicação das bactérias diretamente nas estruturas cimentícias, há a opção de aplicá-las incorporadas em cápsulas, o que pode garantir uma melhor proteção da mesma. Tziviloglou et al. (2016) utilizaram desta técnica em argila expandida, impregnando-as em concentração de  $10^8$  bactérias em formas de esporos por litro, com meio nutriente de 200 g/l de lactato de cálcio e 4 g/l de extrato de levedura através de um meio sob vácuo. Para a avaliação da autocicatrização foram utilizados corpos de prova prismáticos de 4 x 4 x 16 cm. A Figura 6 apresenta duas amostras após cicatrização sob cura imersa por (A) 28 dias e (B) 56 dias. Observa-se que houve praticamente toda a fissura colmatadas. Jonkers (2011) também utilizou bactérias embebidas em argila expandida com lactato de cálcio e obteve bons resultados de cicatrização.

Figura 6 - Autocicatrização em cp's com adição de argila expandida embebida com *bacillus* e nutriente para cicatrização. (A) amostra submersa em água por 28 dias. (B) amostra submersa em água por 56 dias.

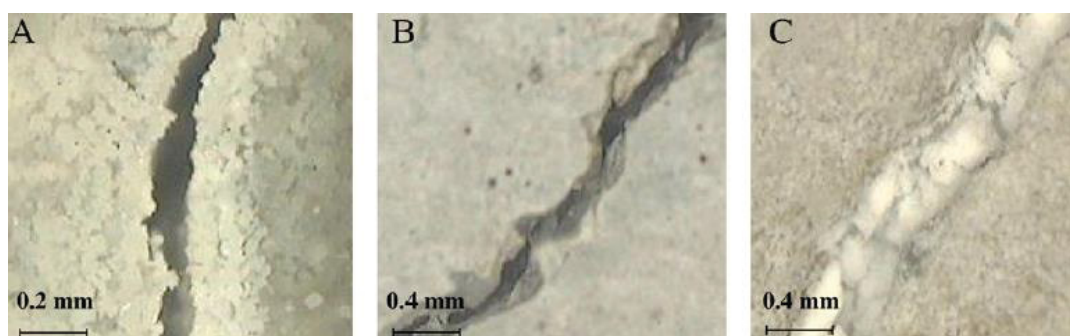


Fonte: Adaptado de TZIVILOGLOU et al. (2016)

No trabalho de Van Tittelboom et al. (2010) dois tratamentos foram comparados, o convencional com o bacteriano. Os tratamentos convencionais foram com resina epóxi e graute, já os tratamentos biológicos foram com seis diferentes meios nutrientes para a bactéria *Bacillus sphaericus*. Das seis cepas, cinco foram revestidas com um produto coloidal de sílica fluido (Lavasil 200/30% sol) para protegê-las da alta alcalinidade do meio cimentício e aumentar a

concentração de bactérias a serem ativadas para a cicatrização. Os métodos com as aplicações convencionais e bacterianas foram eficazes, porém a aplicação sem revestimento por sílica-gel não apresentou formação de cristais de carbonato de cálcio, Figura 7.

Figura 7 - (A) amostra controle. (B) tratamento com *Bacillus sphaericus* + cloreto de cálcio sem o revestimento em sílica-gel. (C) tratamento com *Bacillus sphaericus* revestida em sílica-gel + acetato de cálcio.



Fonte: Adaptado de VAN TITTELBOOM et al. (2010)

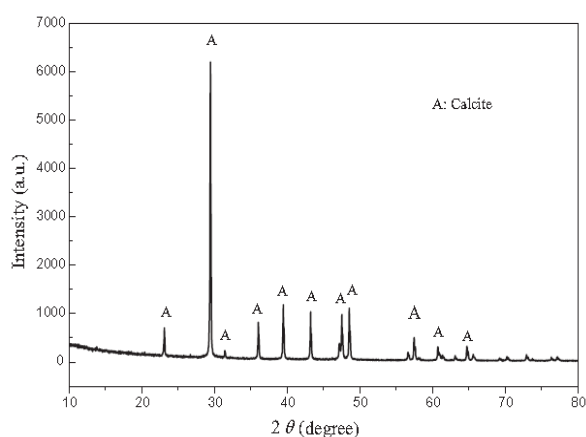
A seguir são apresentadas algumas técnicas que têm sido usadas para mensurar os efeitos da autocicatrização com microrganismos.

### 2.3.1 Difractometria de Raios-X (DRX)

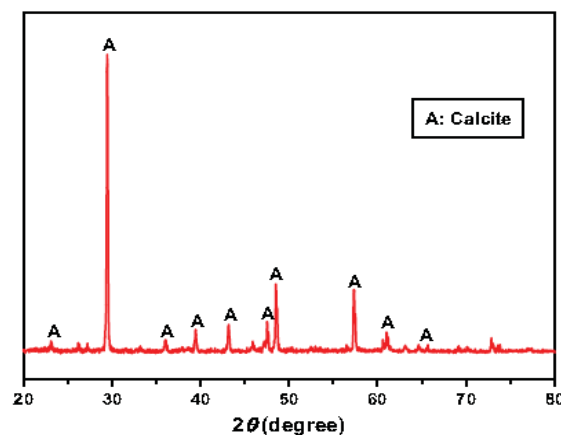
A Difractometria de Raios-X (DRX) é um importante ensaio de caracterização baseado na Lei de Bragg, a partir da identificação da distância interplanar de diferentes cristais. É um método semi-quantitativo para análise das fases mineralógicas, na qual as leituras são pelos picos de difração. Essa é uma das técnicas que auxiliam na verificação se os precipitados dos microrganismos são compostos minerais ou não.

Alguns trabalhos como os de Gollapudi et al. (1995), De Muynck et al. (2008), Luo, Qian e Li (2015), Zhang et al. (2017), Luo & Qian (2016) e Siddique et al. (2016) utilizam o DRX como ferramenta auxiliar de verificação dos minerais formados. A Figura 8 apresenta quatro difratogramas feitos em trabalhos de autocicatrização com microrganismos. Observe que em todos os difratogramas apresentam os picos principais indicativos dos minerais calcita e vaterita, os quais são formados pelo mesmo composto químico, o carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ).

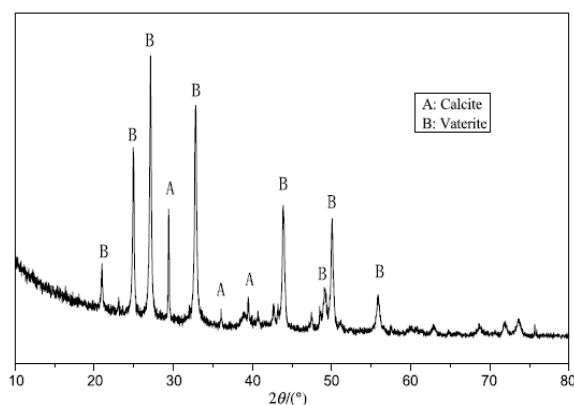
Figura 8 - Quadro com alguns trabalhos acadêmicos que apresentam a técnica de difratometria de raios-X (DRX) para indicar os produtos formados nas fissuras colmatadas



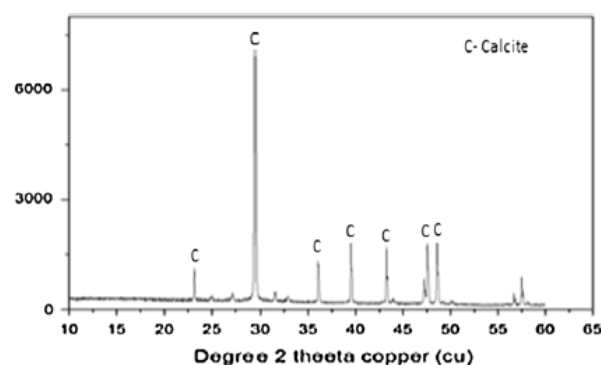
Fonte: LUO, QIAN e LI (2015)



Fonte: ZHANG et al. (2017)



Fonte: LUO e QIAN (2016)



Fonte: SIDDIQUE et al. (2016)

Geralmente, para aumentar a confiabilidade do mineral encontrado no DRX, o mesmo é associado à Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) para poder visualizar as estruturas cristalinas formadas e aumentar o grau de confiança do que foi investigado.

### 2.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

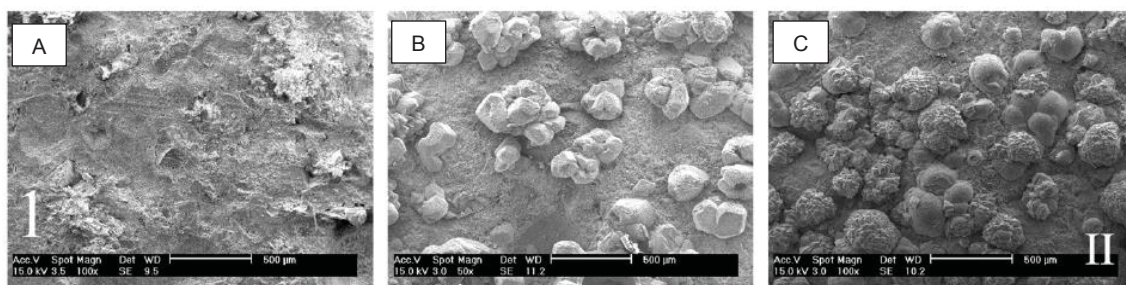
O equipamento de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é capaz de aumentar em até 9000x, em alta qualidade. As imagens produzidas são virtuais, e são visualizadas por um monitor do aparelho de transcodificação. Da mesma forma que o DRX, esse método auxilia na caracterização do material estudado.



A análise de MEV é comumente empregada nos estudos de estruturas autocicatrizantes de base cimentícia, e alguns trabalhos como os de Jonkers et al. (2010), De Muynck et al. (2008a) e De Muynck et al. (2008b) utilizaram este método para poder visualizar os possíveis minerais que se formaram nas microfissuras estudadas.

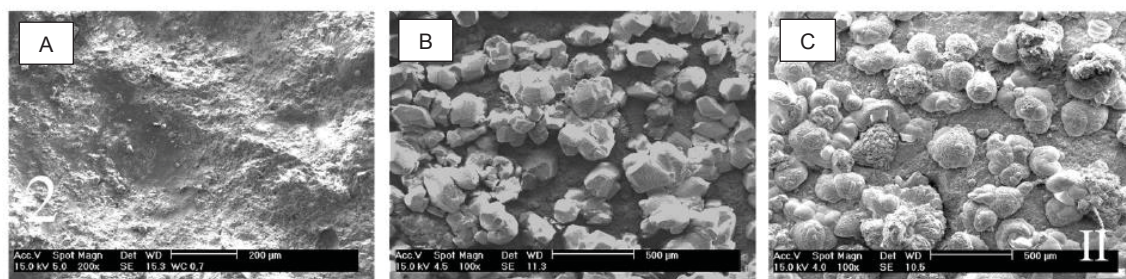
Nas Figura 9 e Figura 10, De Muynck et al. (2008b), através do MEV, apresentam uma amostra de argamassa sem tratamento e com tratamento bacteriano. Os autores observaram deposição de carbonato de cálcio nas amostras com tratamento bacteriano. De acordo com o estudo, a relação água/cimento não influenciou a quantidade de cristais que foram precipitados nas superfícies.

Figura 9 - (A) superfície não tratada -  $a/c = 0,5$ . (B) e (C) cristais da precipitação bacteriana com dimensão de cerca de 100  $\mu\text{m}$ .



Fonte: DE MUYNCK et al., 2008b

Figura 10 - (A) superfície não tratada -  $a/c = 0,7$ . (B) e (C) cristais da precipitação bacteriana com dimensões cerca de 100  $\mu\text{m}$ .



Fonte: DE MUYNCK et al., 2008b

### 2.3.3 Permeabilidade

A permeabilidade é uma propriedade de corpos que permitem o escoamento de água através de seus poros. O coeficiente de permeabilidade ( $k$ ) pode ser calculado pela Lei de Darcy, que representa a velocidade da água que atravessa o corpo, Equação 1.

$$Q = \frac{-k A}{\mu} \times i \quad (1)$$

Onde:  $Q$  é a vazão,  $k$  é o coeficiente de permeabilidade,  $A$  é a área da seção transversal da amostra,  $\mu$  é a viscosidade do líquido que atravessa a amostra e  $i$  representa o gradiente hidráulico.

Essa é uma importante propriedade do material que pode mostrar o desempenho de cicatrização de uma microfissura simplesmente pela redução do coeficiente de permeabilidade, ou seja, quanto menor for o coeficiente  $k$ , menor será a quantidade de líquido que estará correndo pelo interior da amostra. Então, se  $k$  tende a zero, a amostra tenderá a ser impermeável.

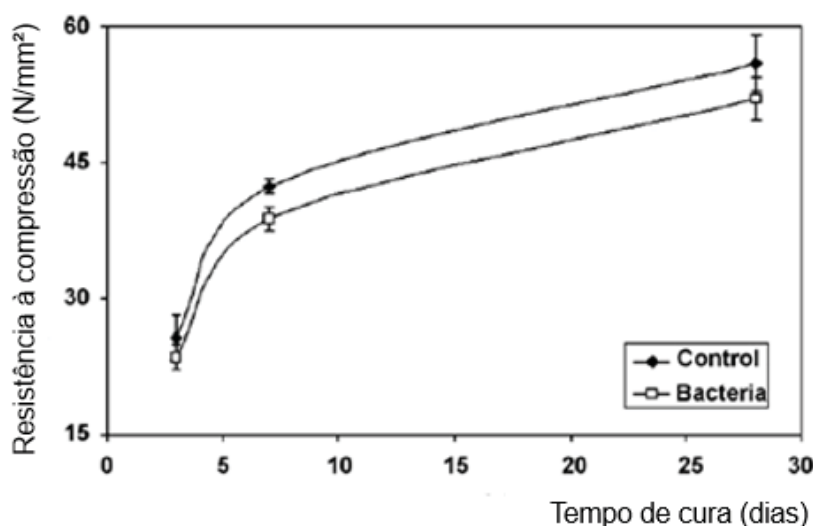
O concreto autocicatrizante estudado nos trabalhos de Jonkers e Thijssen (2010) e Wang, De Belie e Verstraete (2012) atingiram a estanqueidade no concreto após a ativação das bactérias, que consumiram os nutrientes fornecidos na mistura e preencheram as fissuras com a deposição de cristais de carbonato de cálcio. Cailleux e Pollet (2009) e Van Tittelboom et al. (2011) observaram que a permeabilidade em amostras danificadas contendo cápsulas de cicatrização polimérica foi similar a valores obtidos em amostras sem degradação. Yang et al. (2010) conseguiram estanqueidade nas amostras capsuladas com sílica-gel e observaram que houve alta porcentagem na diminuição do coeficiente de permeabilidade das argamassas. Dry (1999) aplicou no tabuleiro de uma ponte de concreto tubos preenchidos com um material adesivo para atuar no preenchimento de possíveis microfissuras, o reparo tubular usado conseguiu manter a estanqueidade do tabuleiro da ponte após tamponamento dos poros.

### 2.3.4 Resistência Mecânica

O material cimentício que passa por uma segunda hidratação produz cristais de carbonato de cálcio que são idênticos aos constituídos na matriz cimentícia na mistura inicial, porém têm propriedades mecânicas inferiores comparadas com a primeira hidratação, pois estes cristais não formam uma característica de adesão com a parede da fissura e sim somente uma característica de preenchimento com as faces (VAN TITTELBOOM; DE BELIE, 2013).

Corroborando com Van Tittelboom e De Belie (2013) sobre a resistência à compressão do concreto, Jonkers et al. (2010) analisaram as resistências de amostras controle e amostras com adição de microrganismos, as com adição bacteriana aos 3, 7 e 28 dias de cura em processo de cicatrização apresentaram resistência à compressão inferiores aos das amostras controle, Figura 11. Na Figura 12, Jonkers e Schlangen (2007) não encontram diferença estatística significativa entre as amostras controle e as amostras com adição da bactéria *Sporosarcina pasteurii*.

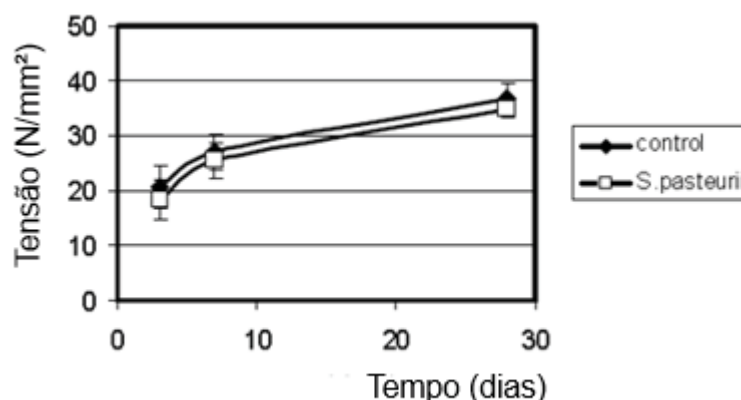
Figura 11 - Desenvolvimento da resistência à compressão (N/mm<sup>2</sup>) x idade (dias) - (concreto bacteriano)



Fonte: Adaptado de JONKERS et al. (2010)

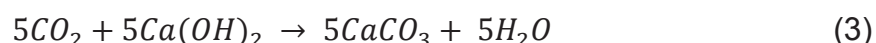


Figura 12 - Amostra controle e amostra com adição da bactéria *sporosarcina pasteurii* (Gráfico - tensão N/mm<sup>2</sup> x tempo-dias)



Fonte: JONKERS e SCHLANGEN (2007)

Jonkers et al. (2010) analisaram o efeito da adição de nutrientes na resistência à compressão. Os autores observaram que a adição de lactato de cálcio obteve uma resistência superior ao controle e as adições de extrato de levedura, peptonas e acetato de cálcio. O mineral de carbonato de cálcio formado na Equação 2 é devido a conversão metabólica bacteriana do lactato de cálcio. Observe que para que essa reação ocorra há necessidade de o meio conter oxigênio. O CO<sub>2</sub> formado tende a reagir com a portlandita e formar mais carbonatos de cálcio, Equação 3.

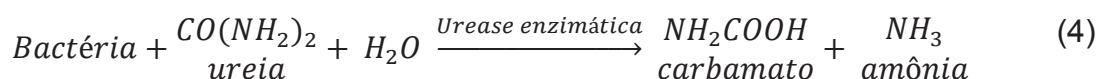


A Equação 3 é similar a reação de carbonatação que ocorre no concreto. Esse processo pode garantir aumento de resistência mecânica, haja vista que o produto gerado pela Equação 3 possui volume maior do que os reagentes da equação química, o que pode deixar o elemento mais denso. Esse fenômeno é conhecido também por colmatagem dos poros e pode ser responsável pela redução da permeabilidade (MEDEIROS; HELENE, 2001).

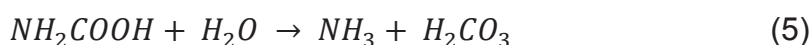
## 2.4 MECANISMO DE AUTOCICATRIZAÇÃO EM MATERIAIS DE BASE CIMENTÍCIA

A precipitação bacteriana de carbonato de cálcio é determinada por alguns fatores, incluindo: o ambiente ideal para dissolver carbonos inorgânicos, o pH, a concentração de íons cálcio e a presenças de sítios de nucleação da calcita. Os três primeiros fatores são relacionadas ao ambiente em que as bactérias são inseridas e o último é dado graças a capacidade da parede celular da bactéria atuar como sítio de nucleação (VAN TITTELBOOM et al., 2010). Siddique e Chahal (2011) e Talaiekhazan et al. (2014) descrevem as reações bioquímicas até a precipitação do carbonato de cálcio como mostram as Equações (4) a (10).

A ureia é hidrolisada a carbamato e amônia na presença da urease induzida pela bactéria, como mostra a Equação (4).



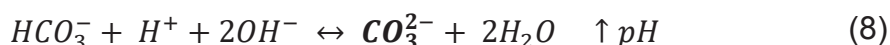
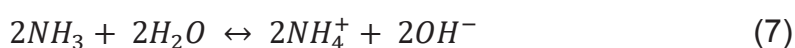
O carbamato é hidrolisado espontaneamente e forma amônia e ácido carbônico, Equação (5).



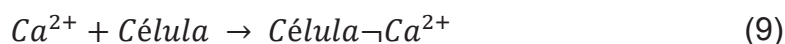
Com a hidrólise do ácido carbônico é formado íon bicarbonato e íon hidrogênio, conforme apresenta a Equação (6).



A amônia é hidrolisada espontaneamente e forma como produto o amônio e o íon hidroxila como mostra a Equação (7). A produção do íon hidroxila faz aumentar o equilíbrio iônico com o íon bicarbonato que consequentemente favorece a reação de equilíbrio e formação do íon carbonato, conforme apresenta a Equação global (8).

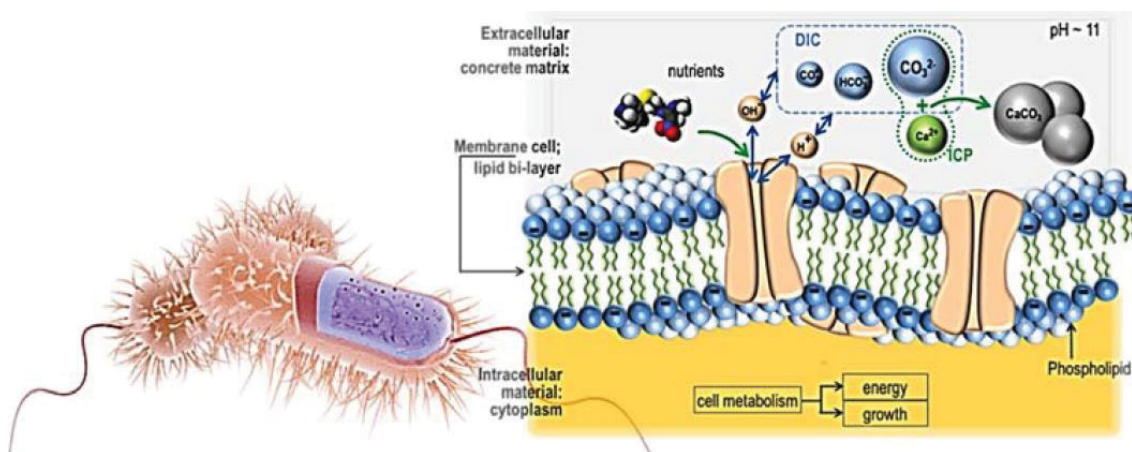


A parede celular das bactérias possuem variedades de íons negativos que podem induzir o deposição mineral de íons  $Ca^{2+}$ , que está presente no meio cimentício. Assim ocorre a reação do íon  $Ca^{2+}$  com o íon  $CO_3^{2-}$ , precipitando o carbonato de cálcio na superfície da célula como mostram as Equações (9) e (10).



A Figura 13 representa o metabolismo do nutriente a dióxido de carbono até o precipitado mineral carbonato de cálcio ( $CaCO_3$ ). Observe a necessidade de dois fatores externos, 1) a adição do meio nutriente para a bactéria e 2) o cátion  $Ca^{2+}$  que possivelmente virá da portlandita ( $Ca(OH)_2$ ).

Figura 13 - Representação das reações bioquímicas na parede celular de uma bactéria

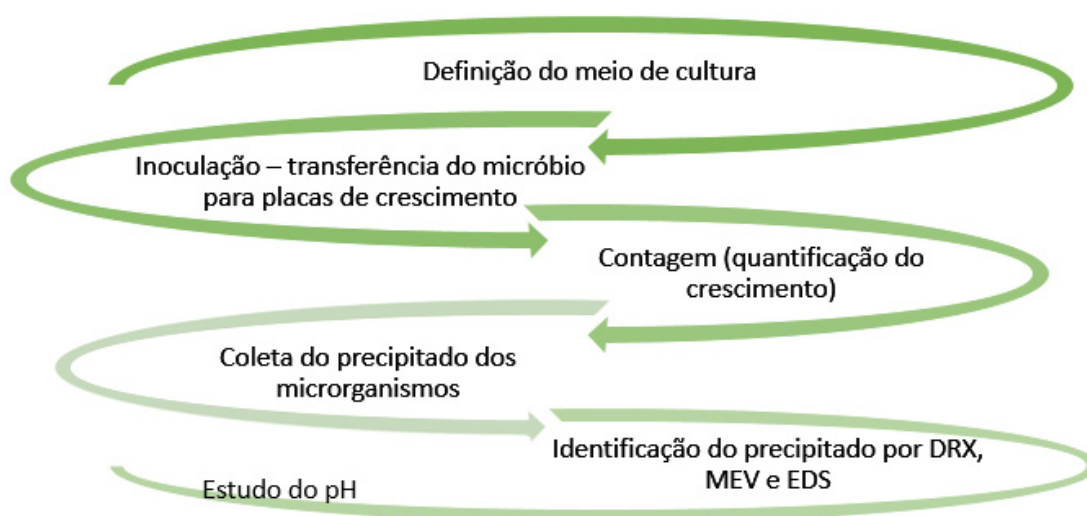


Fonte: SANGADJI (2017)

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos de modo a seguir uma linha de raciocínio lógico para balizar a escolha de microrganismos com o potencial de elaboração de concretos autocicatrizantes. A Figura 14 mostra um fluxograma da sequência de atividades para os testes dos microrganismos

Figura 14 - Fluxograma da sequência de atividades para o teste dos microrganismos



Fonte: O Autor

As variáveis de estudo deste trabalho são:

- Amostras com microrganismos: inicialmente 23 níveis (6 microrganismos conhecidos e 17 desconhecidos). Das 23 amostras classificou-se 10 microrganismos. Na qual foram selecionadas 4 amostras conhecidas e 6 em ordem decrescente de crescimento no meio de cultura referência;
- Reagentes: 5 níveis (Referência + 4 compostos rico em cálcio);

Cruzando as variáveis de estudo verifica-se que o experimento tem  $10 \times 5 = 50$  casos. Sendo assim, o método de identificação do material precipitado foi aplicado somente nessas 10 amostras.

As variáveis de resposta deste programa experimental são:

- Avaliação qualitativa em meio de cultura neutro e alcalino (pH 7, 9, 10, 11 e 12);
- Quantificação do crescimento microbiano com espectrofotômetro;
- Identificação de cristais formados por meio de Difratomia de Raios-X (DRX);
- Identificação de cristais formados por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) associados a Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).

Os parâmetros fixados neste experimento foram:

- Meio nutriente para a formação de culturas (Ágar/Caldo Nutriente);
- Temperatura (30°C) e tempo de incubação (24 h);
- Suspensão no meio de cultura líquido da amostra após inoculação por agitador de tubo vortex por 30 s;
- Adição de 5g/L de água destilada dos reagentes nas amostras.

### 3.1 MATERIAIS

#### 3.1.1 Água Destilada

A água utilizada para diluição dos nutrientes e reagentes em todos os processos do trabalho foi a água destilada (ou deionizada) estéril para evitar a contaminação das amostras por outros microrganismos. O pH da mesma foi aferido por um pHmetro, o pH médio foi de 8,43 para a água destilada contra 7,82 da água fornecida pela Companhia de Abastecimento (Sanepar).

#### 3.1.2 Caldo Nutriente e Ágar Nutriente

O nutriente base para o crescimento dos microrganismos foi o Caldo Nutriente. O Caldo Nutriente adquirido foi o da marca Kasvi. A composição do nutriente é dada pela proporção de 1,0 g de extrato de carne, 2,0 g de extrato de levedura (base proteica rica em carboidratos), 5,0 g de peptona (proteína semi-digerida que serve como fonte de nitrogênio e carbono) e 5,0 g de cloreto de sódio. A diluição adotada foi de 13 g para 1 L de água destilada, conforme

indicação do fabricante. A denominação Caldo é para a execução de culturas líquidas.

O Ágar é um polissacarídeo extraído de algas marinhas vermelhas e possui textura gelatinosa. Ele é usado na microbiologia para a execução de culturas sólidas, como as que são executadas em placas de Petri. Para este trabalho foi usado o Ágar Nutriente que possui a mesma composição que o Caldo Nutriente, a única diferença é a adição do composto Ágar na fração de 15,0 g para 13,0 g do nutriente.

### 3.1.3 Reagentes à base de Cálcio

Os reagentes utilizados para potencializar o crescimento dos microrganismos e induzir a formação de minerais carbonatos foram o Lactato de Cálcio, Acetato de Cálcio, Nitrato de Cálcio e o Cloreto de Cálcio.

Desse modo, foram utilizados quatro reagentes à base de cálcio que foram diluídos na proporção de 5 g para 1 L de água destilada. No trabalho de Shirakawa et al. (2011) foi diluída a mesma proporção (5 g de acetato de cálcio para 1 L de água destilada). Para o presente trabalho essa relação foi fixada para a adição de todos os reagentes. A Tabela 5 mostra um resumo dos reagentes empregados.

Tabela 5 - Reagentes à base de Cálcio

| Reagente          | Fórmula Química                | Origem/descrição  |
|-------------------|--------------------------------|---|
| Lactato de Cálcio | $(C_6H_{10}CaO_6 \cdot 5H_2O)$ | Marca Êxodo Científica (500 g). Pó cristalino, branco, facilmente solúvel em água.      |
| Acetato de Cálcio | $(C_4H_6CaO_4 \cdot H_2O)$     | Marca Biotec Reagentes Químicos, fornecido pela Central de Reagentes Químicos da PUC-PR |
| Nitrato de Cálcio | $(Ca(NO_3)_2)$                 | Fornecido pela Central de Reagentes Químicos da PUC-PR                                  |
| Cloreto de Cálcio | $(CaCl_2)$                     | Fornecido pela Central de Reagentes Químicos da PUC-PR                                  |

Fonte: O Autor

### 3.1.4 Microrganismos

Foram adquiridas 23 amostras com microrganismos: 4 fornecidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz); 1 importada pela empresa LabResearch; 1 adquirida via probiótico em forma de comprimido (com mescla de 2 microrganismos conhecidos); e 17 coletados de aquários de vida marinha e fornecidas pelo Prof. Dr. Luiz Felipe Caron do Departamento de Patologia Básica da Universidade Federal do Paraná. Na Tabela 6 consta um resumo da origem e nomenclatura recebida pelos microrganismos.

Tabela 6 - Origem dos microrganismos

(continua)

| Nº | Origem                  | Microrganismos                                     | Linhagem                | Nomenclatura sugerida |
|----|-------------------------|--|-------------------------|-----------------------|
| 1  | Fiocruz                 | <i>Lysinibacillus sphaericus</i>                   | INCQS-414<br>ATCC-14577 | B-414                 |
| 2  | Fiocruz                 | <i>Lysinibacillus sphaericus</i>                   | INCQS-422<br>ATCC-14577 | B-422                 |
| 3  | Fiocruz                 | <i>Lysinibacillus sphaericus</i>                   | INCQS-423<br>ATCC-33721 | B-423                 |
| 4  | Fiocruz                 | <i>Lysinibacillus sphaericus</i>                   | INCQS-424<br>ATCC-14577 | B-424                 |
| 5  | LabResearch             | <i>Bacillus megaterium</i>                         | ATCC-14581              | B-Meg                 |
| 6  | Probiótico              | <i>Bacillus subtilis</i><br><i>Bacillus cereus</i> | Não fornecida           | B-SC                  |
| 7  | Patologia Básica - UFPR | 1.1 <sup>5</sup>                                   | Desconhecida            | M-11                  |
| 8  | Patologia Básica - UFPR | 1.2  | Desconhecida            | M-12                  |
| 9  | Patologia Básica - UFPR | 1.3  | Desconhecida            | M-13                  |
| 10 | Patologia Básica - UFPR | 2.1  | Desconhecida            | M-21                  |
| 11 | Patologia Básica - UFPR | 2.2  | Desconhecida            | M-22                  |
| 12 | Patologia Básica - UFPR | 2.3  | Desconhecida            | M-23                  |
| 13 | Patologia Básica - UFPR | 3.1  | Desconhecida            | M-31                  |
| 14 | Patologia Básica - UFPR | 3.2  | Desconhecida            | M-32                  |
| 15 | Patologia Básica - UFPR | 3.3  | Desconhecida            | M-33                  |
| 16 | Patologia Básica - UFPR | 4.1  | Desconhecida            | M-41                  |
| 17 | Patologia Básica - UFPR | 4.2  | Desconhecida            | M-42                  |

<sup>5</sup> Todos os microrganismos fornecidos pelo Departamento de Patologia Básica são de vida marinha, logo, a sequência numérica adotada como o nome do microrganismo (terceira coluna da Tabela 6) faz referência ao número do aquário em que o mesmo foi coletado, por isso optou-se por manter a nomenclatura original de recebimento.

Tabela 6 - Origem dos microrganismos

(continuação)

|    |                         |       |              |       |
|----|-------------------------|-------|--------------|-------|
| 18 | Patologia Básica - UFPR | 4.3   | Desconhecida | M-43  |
| 19 | Patologia Básica - UFPR | 5.1   | Desconhecida | M-51  |
| 20 | Patologia Básica - UFPR | 5.2   | Desconhecida | M-52  |
| 21 | Patologia Básica - UFPR | 5.3   | Desconhecida | M-53  |
| 22 | Patologia Básica - UFPR | 6.2   | Desconhecida | M-62  |
| 23 | Patologia Básica - UFPR | 4.3.2 | Desconhecida | M-432 |

Fonte: O Autor

Ainda não se conhece as espécies destes 17 microrganismos marinhos, e a tentativa de aplicação desses micróbios neste trabalho se deu porque os mesmos estavam apresentando grande deposição de carbonatos nos aquários em que viviam. Esse fato despertou interesse, haja vista que os produtos de deposição de microrganismos nas microfissuras são de origem carbonáticas.

Os microrganismos possuem uma Classe de Risco Biológico ou Nível de Biossegurança (Biosafety level - BSL) que é dividida em quatro níveis, de 1 a 4. O BSL-1 é o nível de menor agressividade à saúde, no qual os microrganismos não apresentam riscos à saúde e são seguros de se manusear em laboratórios padrão de microbiologia sem ter a necessidade de equipamentos especiais. Quanto maior o nível BSL, maior o risco de manuseio e infecção, por exemplo: o BSL-4 é o mais agressivo, ou seja, apresentam altos riscos de doenças potencialmente fatais, que podem ser transmitidas via aerossol e para as quais não há vacina disponível. Para trabalhar com este tipo de microrganismo há a necessidade de instalações especiais. Esta configuração em níveis é baseada nas diretrizes de serviço de saúde pública dos Estados Unidos e representam as condições sob as quais os microrganismos podem ser manuseados com segurança (US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1999).

#### 3.1.4.1 *Bacillus megaterium*

O *Bacillus megaterium* ATCC® 14581 foi o primeiro microrganismo a ser adquirido para a pesquisa, importado pela empresa LabResearch. É um microrganismo que possui respiração aeróbica, apresenta bom crescimento no meio de cultura Ágar/Caldo Nutriente, temperatura ideal de crescimento a 30°C,



tempo de incubação indicado de 24 horas e Classe de Risco Biológico ou Nível de Biossegurança igual a 1.

#### 3.1.4.2 *Lysinibacillus sphaericus* (*Bacillus sphaericus*)

O microrganismo *Bacillus sphaericus* teve recentemente uma reclassificação de seu gênero<sup>6</sup>, fazendo parte agora do gênero *Lysinibacillus*. Este microrganismo foi fornecido pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) que é vinculada ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS).

Esses microrganismos foram fornecidos em forma liofilizada. A liofilização é o processo de desidratação em uma câmara especial a vácuo e a baixíssimas temperaturas.

Este microrganismo foi escolhido, pois era o único micróbio que a Fiocruz tinha disponível e que tinha registro de uso como autocicatrizante para concreto (Tabela 4). Foram disponibilizadas quatro linhagens diferentes desta mesma bactéria (Tabela 7).

Tabela 7 - Informações fornecidas pela Fiocruz sobre o microrganismos *Lysinibacillus sphaericus*

| INCQS | Origem                   | Lote   | Meio de Cultura      | Temperatura (°C) | Tempo de incubação (h) | Respiração | Classe de Risco Biológico |
|-------|--------------------------|--------|----------------------|------------------|------------------------|------------|---------------------------|
| 414   | LFB <sup>7</sup><br>902  | 611414 | Ágar/Caldo Nutriente | 37               | 24                     | Aerobiose  | 1                         |
| 422   | CCT <sup>8</sup><br>0514 | 907422 | Ágar/Caldo Nutriente | 30               | 24                     | Aerobiose  | 1                         |
| 423   | CCT<br>2225              | 607423 | Ágar/Caldo Nutriente | 30               | 24                     | Aerobiose  | 1                         |
| 424   | CCT<br>2226              | 607424 | Ágar/Caldo Nutriente | 30               | 24                     | Aerobiose  | 1                         |

<sup>6</sup> Ver a referência taxonômica de um microrganismo na Tabela 3.

<sup>7</sup> Laboratório de Fisiologia Bacteriana, LFB, do Instituto Oswaldo Cruz. Esse microrganismo teve origem da Coleção de Culturas do Gênero *Bacillus* e Gêneros Correlatos (CCGB) da Fiocruz. Link: <http://ccgb.fiocruz.br/> (último acesso 05/04/2019).

<sup>8</sup> Coleção de Culturas Tropicais, CCT, da Fundação Andre Tosello. Link: <http://fat.org.br/> (último acesso 05/04/2019).

Todo microrganismo fornecido pela Fiocruz possui um código de identificação denominado INCQS, um código de origem, número de lote, o meio de cultura ideal para crescimento, tipo de respiração, classe de risco biológico e temperatura e tempo de incubação. Ou seja, são fornecidas todas as informações importantes para iniciar o trabalho com o micróbio. Na Tabela 7 são apresentadas as informações iniciais fornecidas sobre o microrganismo *Lysinibacillus sphaericus*.

#### 3.1.4.3 *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*

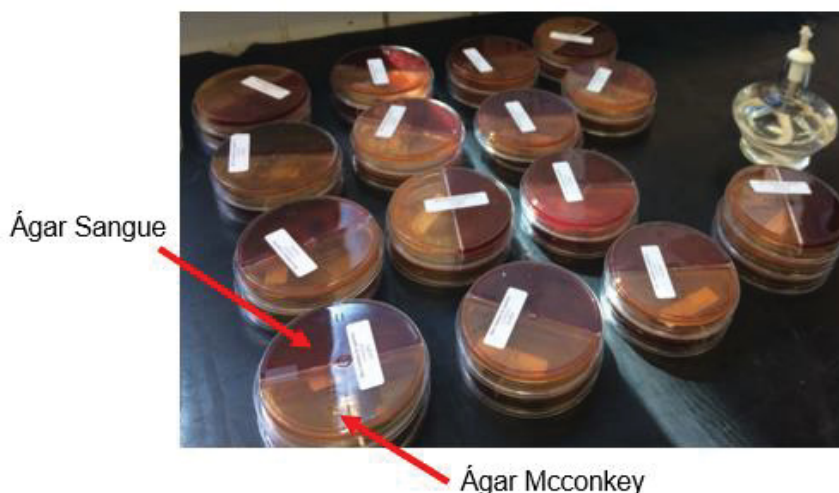
Estes dois micróbios foram isolados de um probiótico da marca GlobionPET, que é um suplemento vitamínico mineral para cães e gatos, medicamento de uso oral. Como não se obteve nenhuma informação adicional sobre essas duas bactérias, foram considerados como meio de cultura, temperatura e tempo de incubação os mesmos que os microrganismos dos itens 3.1.4.1 e 3.1.4.2. Uma das desvantagens desses microrganismos é que não há um código que indica a sua linhagem, por exemplo, o seu número ATCC, INCQS, CCT e etc.

#### 3.1.4.4 Microrganismos de vida marinha

As placas com os 16 microrganismos marinhos foram recebidas contendo dois nutrientes, Ágar sangue (cor vermelho) e Ágar mcconkey (cor laranja), Figura 15. O Ágar sangue foi utilizado porque possui uma base rica nutricional e oferece ótimas condições de crescimento para a maioria dos microrganismos de acordo com o Manual de Exames Microbiológicos da Anvisa (2004). Em geral, o crescimento em Ágar sangue costuma ser abundante, fato que favorece a coleta dos microrganismos para outro meio nutriente. O Ágar mcconkey é utilizado junto com o Ágar sangue porque ajuda na segurança de seleção dos microrganismos coletados em campo, este possui o efeito de inibir o crescimento de possíveis micróbios que podem causar doenças infecciosas, como as causadas por estafilococos e enterococos (por exemplo: prostatite, infecção de feridas, infecção do trato urinário e etc).

Cada placa contém uma numeração que é referente ao aquário no qual o micróbio foi coletado, assim como foi evidenciado na Tabela 6. Uma investigação mais detalhada em relação ao gênero e espécie desses microrganismos deve ser feita, pois não se sabe com que tipo micróbio trabalha.

Figura 15 - Placas de Petri contendo os microrganismos coletados dos aquários de vida marinha - placas com Ágar Sangue e Ágar Mcconkey



Fonte: O Autor

Estes microrganismos foram incorporados ao trabalho porque podem se comportar como organismos calcificadores, assim como os corais. A calcificação nos corais é um processo fisiológico de incorporação do cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e carbono inorgânico ( $\text{HCO}_3^-$ ) presentes no ambiente marinho, e eliminação dos prótons ( $\text{H}^+$ ) do processo de mineralização ( $\text{Ca}^{2+} + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CaCO}_3 + \text{H}^+$ ) (MARANGONI; MARQUES; BIANCHINI, 2016).

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Crescimento microbiano

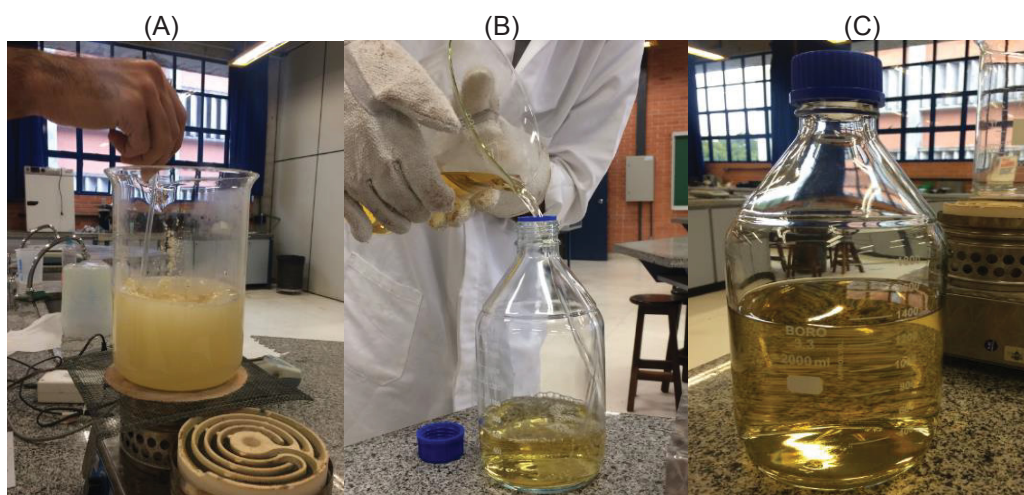
O crescimento microbiano se refere ao número de células que serão formadas e agrupadas em colônias e não ao tamanho celular individual. Para que ocorra o crescimento são necessárias algumas intervenções que podem ser divididas em fatores físicos e químicos. Os fatores físicos podem ser a temperatura, tempo, pH e etc., já os fatores químicos se referem às fontes

nutricionais dos microrganismos e reagentes a que serão expostos em seus devidos meios de cultura.

O nutriente preparado em laboratório para o crescimento dos microrganismos é chamado de meio de cultura, e para este trabalho foi utilizado o meio de Caldo Nutriente e Ágar Nutriente.

A diluição do Caldo Nutriente foi feita em um Becker graduado de vidro em que a mistura foi aquecida em um aquecedor elétrico até ganhar aparência uniforme. Após a diluição, o caldo foi esterilizado em um frasco reagente graduado a 121 °C por 15 minutos em uma autoclave vertical, Figura 16.

Figura 16 - Processo de execução do meio nutriente líquido: (A) aquecimento do meio nutriente para uniformização. (B) e (C) frasco reagente com meio nutriente pronto para autoclave

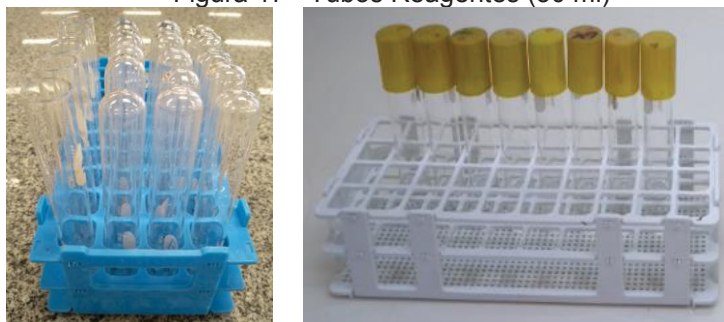


Fonte: O Autor

### 3.2.2 Inoculação

Antes de efetuar a inoculação foi necessário esterilizar os tubos reagentes que receberam as amostras. Para isso, os mesmos foram descontaminados em uma autoclave vertical a 121 °C por 15 minutos. Após o resfriamento o Caldo Nutriente foi dosado com uma pipeta volumétrica em um volume de 10 ml e adicionado nos tubos reagentes. Com o meio nutriente inserido nos tubos o próximo passo foi efetuar a inoculação dos microrganismos. A Figura 17 apresenta os tubos utilizados no trabalho.

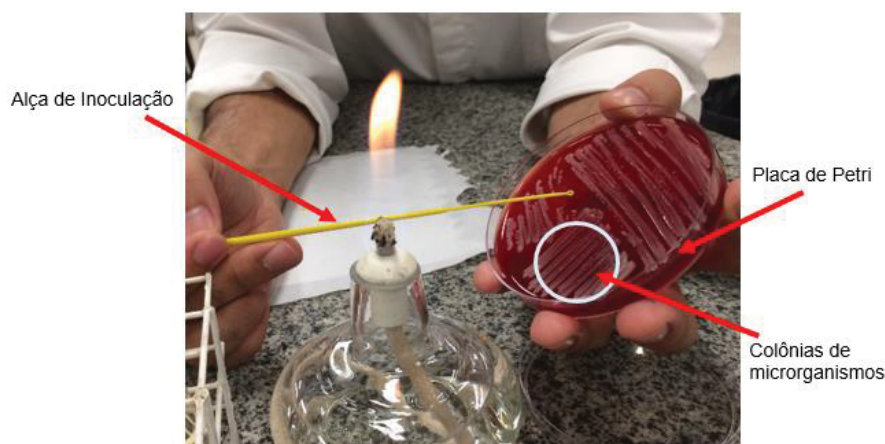
Figura 17 - Tubos Reagentes (50 ml)



Fonte: O Autor

A inoculação é o ato de coletar uma amostra do microrganismo em um meio de cultura através de uma alça de inoculação (alça de coleta) e transferir para outro meio de cultura. A Figura 18 apresenta a alça de inoculação, uma placa de Petri e uma colônia de microrganismo que estava sendo transferida para outro meio.

Figura 18 - Ilustração da execução da Inoculação



Fonte: O Autor

A inoculação foi executada em uma capela de fluxo laminar com o auxílio de um bico de Bunsen, Figura 19. Neste experimento, a função do bico de Bunsen é esterilizar a alça de inoculação após a mesma efetuar a coleta do microrganismo e transferir para o tubo de ensaio. Após a transferência da amostra para os tubos de ensaio, os mesmos foram submetidos a um agitador de tubos vortex por 30 segundo para garantir a dispersão dos micróbios inseridos no nutriente. Depois dessas etapas, os tubos foram inseridos em uma estufa de ensaios microbiológicos sob uma temperatura de 30°C por 24 horas. Essa

temperatura e o tempo de incubação foram fixados para todos os microrganismos do trabalho.

Figura 19 - Capela de fluxo laminar



Fonte: O Autor

### 3.2.3 Renovação das culturas bacterianas

A renovação das culturas bacterianas é o ato de se renovar o ambiente nutritivo que vivem os microrganismos. Isso deve ser feito periodicamente, pois com o tempo os nutrientes das placas de Petri vão se extinguindo devido ao consumo dos mesmos pelos microrganismos que lá estão.

No início do projeto houve a intenção de se adotar o meio de cultura à base de Ágar Sangue, pois os microrganismos apresentaram ótimo crescimento neste meio, porém o orçamento do projeto não permitiu. Além disso, o tempo de troca se tornava bem menor devido ao baixo tempo de conservação comparado a outros meios, então, visando a viabilidade do trabalho optou-se em produzir as próprias placas com um meio de cultura que propiciasse uma melhor conservação e economia da placa. Sendo assim, foi feita uma consulta ao Manual de Descrição dos Meios de Cultura da ANVISA (2004) buscando qual seria o meio ideal para conservação e transporte dos meios de cultura. A princípio, no manual estão indicados quatro meios: Cary Blair, Salina Tamponada, Meio Stuart e Ágar Nutriente.

Os meios Cary Blair e Salina Tamponada foram descartados porque os microrganismos como os coliformes fecais sobrevivem bem neste meio, o que potencializaria uma eventual contaminação, caso ocorresse. Esses dois meios



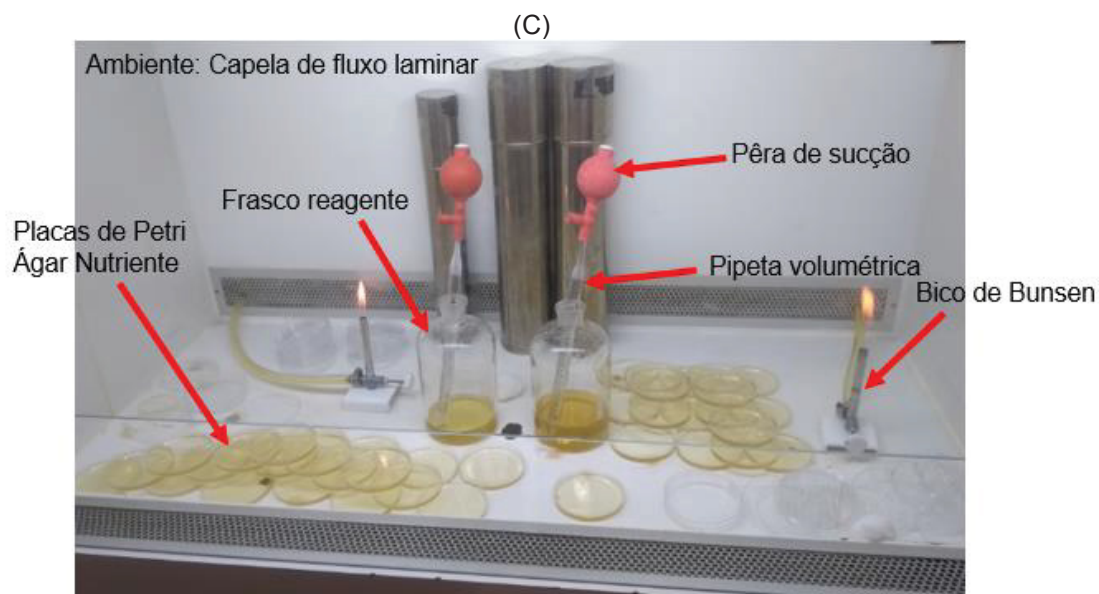
são especialmente para a conservação de fezes. O Meio Stuart foi descartado por apresentar baixo tempo de conservação, de 1 a 2 semanas.

O meio Ágar Nutriente foi o escolhido por ser um meio barato e de fácil preparação. Este meio é indicado como método opcional para laboratórios que não possuem ultra congeladores como método de crioconservação (conservação dos microrganismos à  $-80^{\circ}\text{C}$ ). As placas, com microrganismos, mantidas em Ágar nutriente, quando embaladas, podem conservar até 3 meses em temperaturas de 4 a  $8^{\circ}\text{C}$ .

A partir da segunda renovação de placas, o meio de cultura utilizado até o fim do trabalho foi o Ágar nutriente. O método de produção deste meio é similar ao executado para o Caldo nutriente, apresentado pela Figura 16. Após a autoclavagem do meio de cultura com o Ágar Nutriente é necessário a utilização de uma capela de fluxo laminar para que a transferência do meio para as placas de Petri não seja susceptível a contaminações. Para cada placa foi transferida uma quantia de aproximadamente 20 ml de Ágar nutriente. As placas utilizadas no trabalho foram placas de polipropileno descartáveis de 90 x 15 mm. A Figura 20 mostra os materiais envolvidos no processo.

Figura 20 - (A) ágar nutriente. (B) placas de petri (90 x 15 mm) - estéril / descartável. (C) placas de petri com ágar nutriente sendo preparadas





Fonte: O Autor

### 3.2.4 Métodos de contagem - a quantificação do crescimento microbiano

Os métodos de quantificação de populações microbianas são utilizados para se estimar a quantidade de microrganismos existentes em uma amostra. Para isso, foram adotados métodos quantitativos para se calcular essas concentrações. Para este trabalho serão utilizados três métodos de contagem: a leitura da densidade óptica por Espectrofotômetro, o método das Diluições Seriadas em placas de Petri e a contagem celular em Câmara de Neubauer.

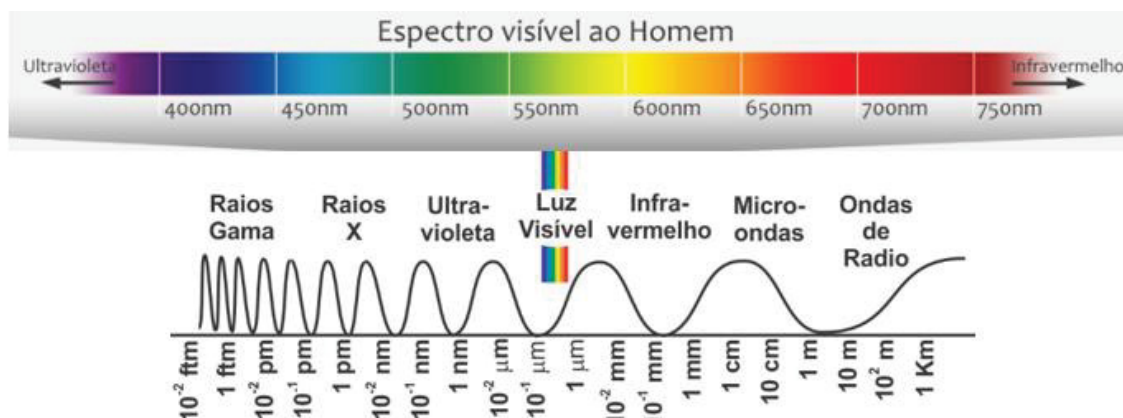
O intuito da contagem é poder quantificar e avaliar o crescimento das amostras e ter uma estimativa real da concentração dos microrganismos nos meios de culturas.

#### 3.2.4.1 Leitura da densidade óptica por Espectrofotometria

Este método é uma técnica de interação entre energia e matéria que se baseia na quantificação da absorção ou transmissão de um espectro eletromagnético que incide em uma determinada área da amostra por um certo tempo. A Figura 21 apresenta um esquema do espectro de radiação eletromagnética (luz visível).



Figura 21 - Espectro de radiação eletromagnética



Fonte: Adaptado de WIKIPÉDIA - Espectro Visível (2019)

Para este trabalho será quantificada somente a absorção de energia de um meio de cultura líquida com o objetivo de estimar a concentração bacteriana em suspensão. Pode-se considerar a Absorbância (ABS) como uma medida indireta de concentração do soluto, no qual a relação entre absorbância e concentração é conhecida como a Relação de Beer-Lambert. Essa relação é expressa em função do comprimento de onda da luz incidente, pela distância percorrida do feixe luminoso que atravessa a amostra e pela concentração do meio microbiano. Logo a absorbância de luz a cada comprimento de onda é diretamente proporcional à concentração da solução contida na cubeta<sup>9</sup>.

A Figura 22 mostra o esquema de funcionamento de um espectrofotômetro de luz visível. O princípio se baseia na emissão de um feixe de luz que passa por um elemento de dispersão que separa a luz em feixes de comprimentos de ondas diferentes. O feixe espectral com comprimento de onda conhecido passa pela cubeta que contém a amostra que será analisada, por fim um detector faz a leitura da Absorbância (ABS).

<sup>9</sup> A cubeta é um frasco que recebe a amostra para receber a fonte de radiação do equipamento, conforme apresentada na Figura 22.

Figura 22 - Esquema de funcionamento de um Espectrofotômetro



Fonte: Adaptado de INFOESCOLA - Espectrofotômetro (2019)

Neste trabalho foi utilizado o Espectrofotômetro da marca Micronal B572 apresentado na Figura 22, que fica situado no Laboratório de Microbiologia da Usina Piloto da PUC-PR. O mesmo possui região espectral de 340 a 1000 nm e como recipientes cubetas retangulares de vidro óptico de 10 mm. O comprimento de onda adotado para as leituras foi de 600 nm.

Este ensaio tem grande importância para este trabalho, pois possibilitou a classificação das amostras que melhor apresentaram crescimento dentre as 23 estudadas. A partir desse ensaio somente as 10 primeiras amostras que melhor apresentaram crescimento ao meio de cultura Caldo Nutriente foram escolhidos para ter adições dos reagentes à base de cálcio.

### 3.2.4.2 Contagem em placas de Petri - Método de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Este método consiste na determinação do tamanho de uma população bacteriana. Este é um dos métodos mais utilizados e possui a vantagem de quantificar somente os microrganismos viáveis. O método considera que cada formação de colônia na placa de Petri seja oriunda de um único micróbio, então a contagem em placas são frequentemente chamadas de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

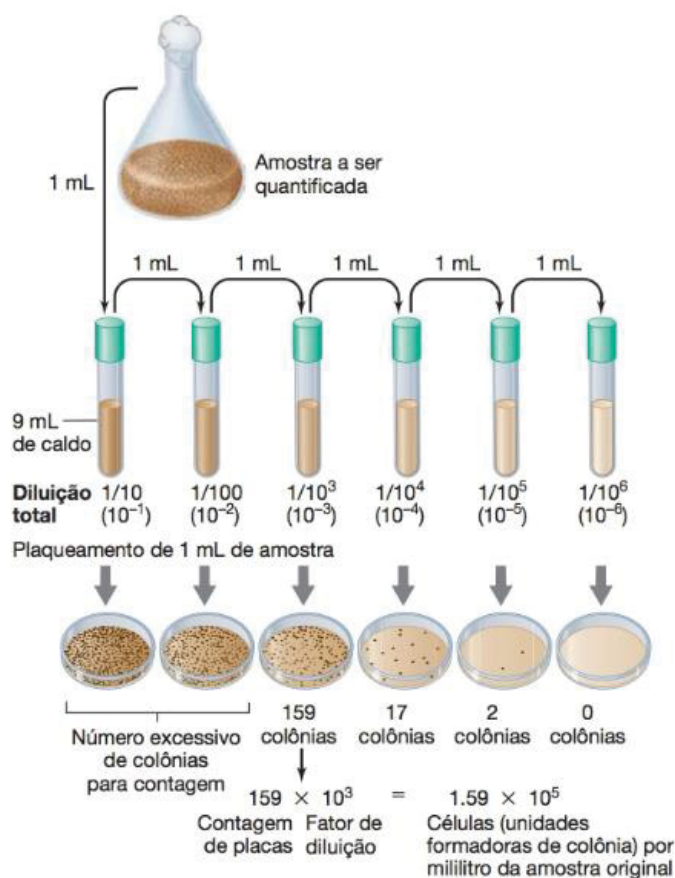
No procedimento da diluição seriada, conforme a Figura 23, o inóculo possui volume de 1 ml que é retirado da amostra a ser quantificada, no qual o mesmo é diluído em uma série de tubos de ensaio em um volume igual a 9 ml de solução fisiológica 0,9%. Logo, cada tubo que contém 9 ml de solução fisiológica receberá o volume de 1 ml do tubo anterior, e assim completar 10 ml de volume no tubo reagente. Após as diluições serem finalizadas, os meios são transferidos na quantidade de 0,1 ml para as placas de Ágar Nutriente e submetidas a uma estufa a uma temperatura de 30°C por 24 horas para iniciar o crescimento. Geralmente são consideradas apenas as placas com contagens entre 30 e 300 colônias ou UFC (MADIGAN; MARTINKO; PARKER, 2004). Quando não forem encontradas placas que estejam nesse intervalo de contagens, apresentar a mais próxima de 300 colônias. A contagem microbiana é feita a olho nu, após isso, computar a contagem segundo a Equação 11.

$$\text{UFC/ml} = \frac{\text{nº de colônias contadas}}{\text{volume da amostra usada (ml)}} \quad (11)$$

Esse ensaio só foi realizado para o microrganismo *Lysinibacillus sphaericus* INCQS 422 (B-422), que foi o que melhor apresentou crescimento no meio de cultura Ágar/Caldo Nutriente baseada no ensaio do espectrofotômetro. Logo, foram feitas 9 diluições e computadas em placas as diluições de  $1/10^4$  até  $1/10^9$ , ou seja, por reagente foram utilizadas 6 placas de Petri. Contabilizando todos os reagentes que são 5, tem-se 30 placas para uma única bactéria.

Para este trabalho seria economicamente inviável executar este ensaio para todos os 10 microrganismos, pois haveria a necessidade de um total de 300 placas somente para este experimento, haja vista que os custo desse experimento foi custeado pelo autor do trabalho, no qual cada placa com o nutriente saiu uma média de R\$ 3,00.

Figura 23 - Procedimento de contagem em placas e diluições seriadas

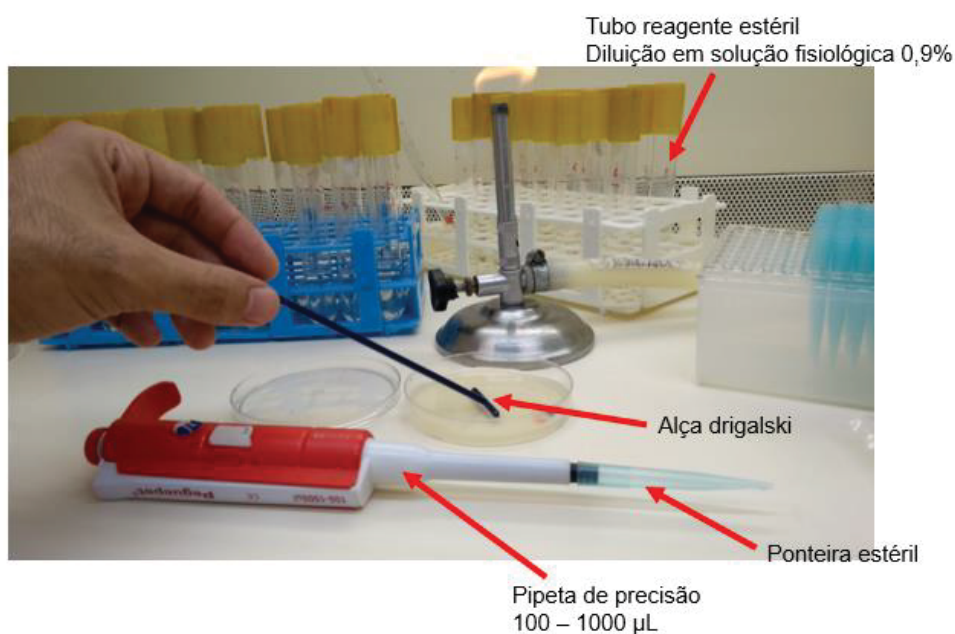


Fonte: MADIGAN, MARTINKO e PARKER (2004)

Este ensaio é necessário que seja executado na capela de fluxo laminar para evitar possível infecção externa. Para a transferência do inóculo de tubo em tubo e para a placa é necessário que seja utilizada uma pipeta de precisão. Para o espalhamento do inóculo é necessário que seja utilizada uma alça drigalski (forma de T) para garantir o espalhamento até a absorção completa do meio diluído no ágar nutriente inserido na placa. A Figura 24 apresenta o

espalhamento de uma amostra diluída em uma placa de Petri à base de Ágar Nutriente.

Figura 24 - Dlução seriada - espalhamento do inóculo na placa de petri pela alça drigalski

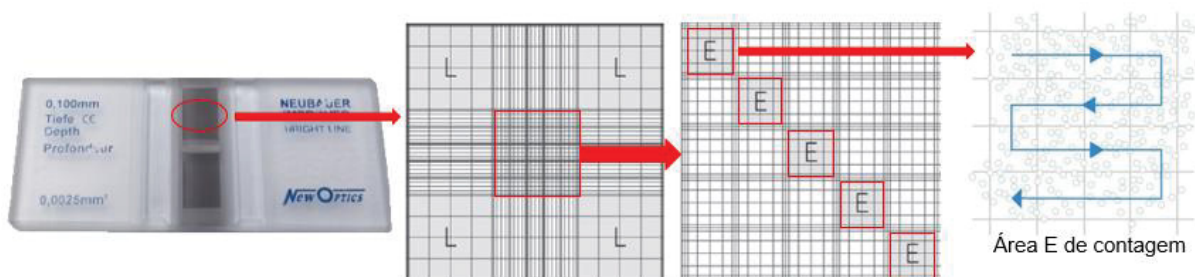


Fonte: O Autor

### 3.2.4.3 Contagem celular em Câmara de Neubauer

A Câmara de Neubauer consiste em uma lâmina espessa na qual existe uma marcação com 9 quadros grandes, cada um de  $1 \text{ mm}^2$  conforme mostra a Figura 25. Os quatro quadrados grandes demarcados com a letra L são divididos em 16 quadrados menores com arestas iguais a  $0,25 \text{ mm}$ . O quadrado central é dividido em 25 quadrados medianos de aresta igual a  $0,2 \text{ mm}$  indicados pela letra E, no qual o mesmo é dividido em mais 16 quadrados pequenos de aresta  $0,05 \text{ mm}$ .

Figura 25 - Esquema da Câmara de Neubauer e suas demarcações



Fonte: Adaptado de BRAND (2013)

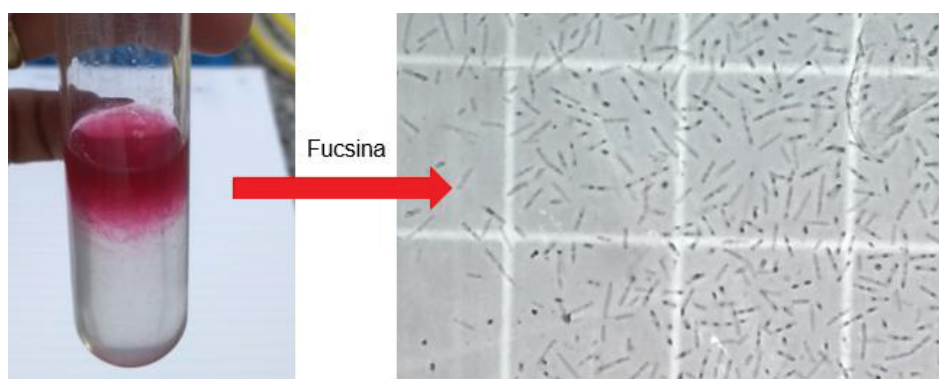
A contagem é feita nas cinco áreas indicadas pela letra E da Figura 25, com volume total aplicado de 1 µL da amostra seguindo o caminho indicado. Após a contagem nos grides a Equação 12 deve ser utilizada para quantificar a real contagem de células.

$$R = r \times 50 \times \text{taxa de diluição} \quad (12)$$

Onde:  $R$  é o valor real da contagem de células (células/µl),  $r$  o somatório das cinco células contadas no quadrado central e o 50 vem da transformação da área contada (mm<sup>2</sup>) e da profundidade da câmara (mm).

Para que os microrganismos fossem melhor identificados foi utilizado um produto químico corante de cor magenta chamado Fucsina. Para cada tubo com 10 ml de volume foram utilizadas duas gotas do produto. A Figura 26 apresenta um tubo de ensaio com duas gotas de fucsina antes da agitação e à direita na mesma imagem microrganismos corados.

Figura 26 - A esquerda tubo de ensaio com duas gotas de fucsina e a direita microrganismo corados



Fonte: O Autor

Para este trabalho, a contagem foi feita somente para o microrganismo *Lysinibacillus sphaericus* INCQS 422 (B-422) para servir de comparação com o experimento da diluição seriada e atestar a acurácia do mesmo. Como a diluição seriada foi feita somente para o B-422, neste foi fixado também somente para esse micróbio.



### 3.2.5 Método de coleta do precipitado dos microrganismos

A coleta dos precipitados foram feitas nos 10 microrganismos que melhor apresentaram crescimento conforme o item 3.2.4.1. Todas as coletas foram feitas com os microrganismos nas presenças dos quatro reagentes à base de cálcio e na presença do Caldo Nutriente sozinho.

Primeiro, foram produzidos cinco meios diferentes em volume de 50 ml para cada espécie de microrganismo. A amostra de controle foi executada sem os microrganismos, nos quais esses 5 frascos foram submetidos aos mesmos procedimentos que as anteriores para aferir se os precipitados são realmente originados dos micróbios e não de uma reação entre os próprios reagentes. Na Tabela 8 consta um resumo da quantidade de amostras.

Tabela 8 - Quantidade das amostras para coleta dos precipitados

|   | <b>Microrganismo</b> | <b>Meio de Cultura<sup>a</sup></b> | <b>Total de amostras</b> |
|---|----------------------|------------------------------------|--------------------------|
| Contagem de amostras com microrganismos | 10                   | 5                                  | 50                       |
| Controle <sup>b</sup>                   | -                    | 5                                  | 5                        |
| <b>TOTAL</b>                            |                      |                                    | <b>55</b>                |

<sup>a</sup>Os meios de cultura são: 1° Caldo Nutriente (CN); 2° CN com adição de Lactato de Cálcio 5g/l; 3° CN com adição de Acetato de Cálcio 5g/l; 4° CN com adição de Nitrato de Cálcio 5g/l; 5° CN com adição de Cloreto de Cálcio 5g/l.

<sup>b</sup>Amostras sem microrganismos.

Após execução dos meios de cultura, as amostras foram levadas para uma estufa com agitação e submetidas à temperatura de 30°C a uma rotação de 100 rpm durante 14 dias para comprovar se houveram ou não depósitos de precipitados bacterianos. A Figura 27 apresenta a estufa com os microrganismos em seus respectivos meios de cultura.

Figura 27 - Estufa com agitação com as amostras microbianas

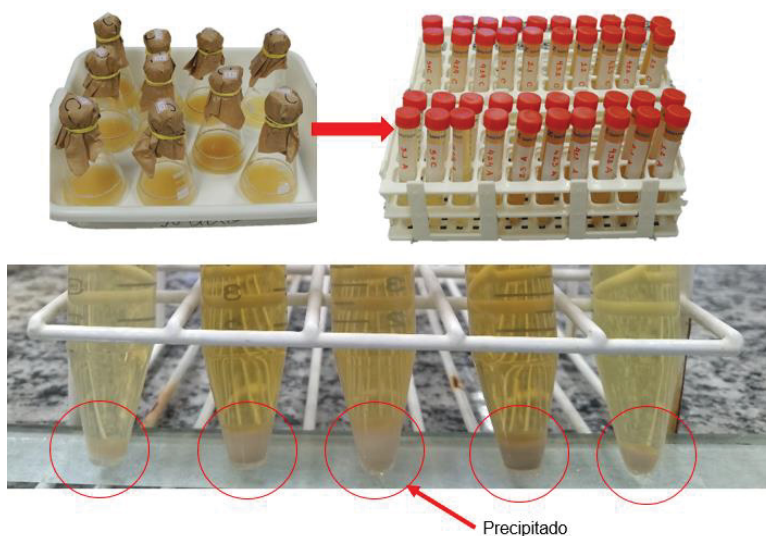


Fonte: O Autor

Após 14 dias, os meios foram vertidos em tubos tipo Falcon de polipropileno de 15 ml de volume e submetidos a centrifugação para acelerar a sedimentação da fase precipitada.

Foi utilizada a Centrífuga Excelsa Baby II Modelo 206-R, a rotação adotada foi de 1000 rpm durante 20 min para sedimentação dos precipitados para cada grupo de 8 tubos. A Figura 28 ilustra a sedimentação dos precipitados após centrifugação. Logo após a centrifugação, os sedimentos foram transferidos para pequenas placas de vidro na qual foram submetidos a uma estufa com temperatura de 40°C por 48 horas.

Figura 28 - Precipitado dos microrganismos

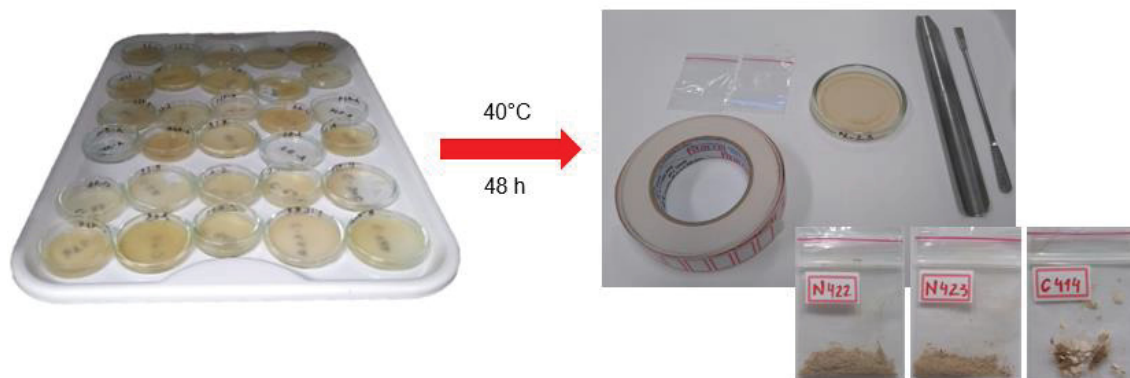


Fonte: O Autor



Após às 48 horas na estufa, foram feitas as coletas dos precipitados com a ajuda de uma espátula e uma pinça devidamente limpas e colocados em pequenos recipientes plásticos zip lock, conforme apresenta a Figura 29.

Figura 29 - Coleta do Precipitado e recipientes plásticos



Fonte: O Autor

O objetivo da coleta do precipitado é para posterior análise de Difratomia de Raio-X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), de modo a identificar os materiais coletados.

### 3.2.6 Difratomia de Raios-X (DRX)

A Difratomia de Raios-X foi empregada neste trabalho para identificar os minerais que compõem o material precipitado coletado em cada série.

As análises dos minerais oriundos da precipitação dos microrganismos foram realizadas em um difratômetro de raios X (Shimadzu MAXima XRD-7000), operando a 40 kV e 30 mA. Os parâmetros de ensaio foram: ângulo de 10° a 70°, passo de 0,017° e velocidade de varredura de 2°/min. Este equipamento fica situado no Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da PUC-PR. Para o refinamento dos dados foi utilizado o software X'Pert Highscore Plus com banco de dados cristalográficos da *International Center for Diffraction Data* (ICDD) de 2003.

### 3.2.7 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

O MEV possibilita a observação por imagem da estrutura da amostra, o que facilita a identificação de qual o mineral que está sob análise. Neste trabalho também foi realizada a análise por energia dispersiva (EDS), pois o mesmo possibilita investigar quais os elementos presentes na amostra.

Os precipitados dos microrganismos foram visualizados em forma de pó, assim como foi apresentado pela Figura 29. O MEV foi realizado pelo equipamento TESCAN S8000 que fica situado no Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica da PUC-PR. Nas mesmas amostras que foram visualizadas pelo MEV foram feitas as Espectroscopias de Energia Dispersiva (EDS) pelo equipamento da Oxford Instruments (detector x-Act) que fica acoplado ao equipamento de microscopia eletrônica de varredura.

### 3.2.8 Crescimento dos microrganismos no pH alcalino

Foram realizados os crescimentos microbianos dos microrganismos com alteração do pH do meio de cultura. Quatro pH's foram adotados: pH = 9, pH = 10, pH = 11 e pH = 12. O objetivo deste experimento é simular o meio de uma estrutura de concreto, que tem característica alcalina. Somente para os microrganismos com o pH 12 foi induzidas as precipitações, pois essa é a faixa de pH que representa a característica de um material de base cimentícia.

A alteração do pH do meio de cultura foi realizada pelo composto químico hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) para manter o meio rico com o elemento cálcio e semelhante a solução do poro do concreto. O pH foi alterado utilizando um pHmetro de bancada e o pH base das amostras eram neutras (pH = 7,0).

Este experimento foi realizado com 10 amostras de microrganismos e o meio de crescimento base foi o Caldo Nutriente. Após a execução dos meios nutrientes e o ajuste do pH, os mesmos foram esterilizados em uma autoclave vertical a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento dos recipientes, foram realizados os processos de inoculação e os mesmos foram submetidos a uma estufa com temperatura de 30°C por 24 horas.

Após o período de incubação, as amostras foram submetidas às leituras de densidade óptica por Espectrofotometria, conforme o item 3.2.4.1. Após a leitura, as amostras com pH 12, foram submetidas a centrifugação a 1000 rpm por 20 minutos para se efetuar a coleta do material precipitado pelos microrganismos. Após a centrifugação foi feita a coleta do material sedimentado no fundo do recipiente e o mesmo foi submetido a uma estufa a 40°C por 48 horas para secagem do material.

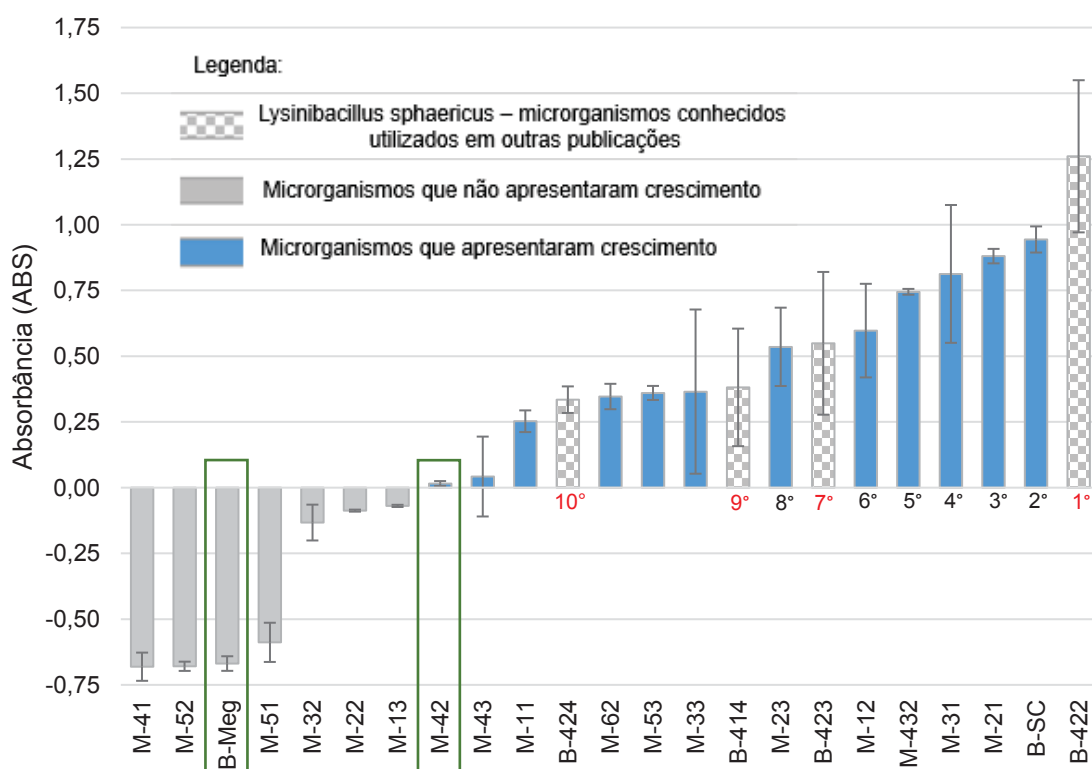
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 CLASSIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Os microrganismos foram classificados, segundo o crescimento no meio de cultura Caldo Nutriente após 24 horas de incubação em estufa a uma temperatura de 30°C, através da leitura do espectrofotômetro. Na Figura 30 é apresentado o crescimento em ordem crescente. Os valores negativos no gráfico significam que os microrganismos não apresentaram concentrações da solução nutriente mais microrganismos diferentes da amostra controle, o que mostra que não houve crescimento nas amostras de M-41 até M-13.

O *Bacillus megaterium* (B-Meg) e o microrganismo marinho M-42, indicados na Figura 30, apesar de não apresentarem crescimento também não passaram no teste de normalidade de Shapiro-Wilk e foram excluídos da classificação. Todas as outras 21 amostras passaram no teste de normalidade. Os dados das leituras no espectrofotômetro e as análises estatísticas estão no Apêndice I.

Figura 30 - Gráfico de crescimento dos microrganismos no meio de cultura Caldo Nutriente



Fonte: O Autor

Todos os microrganismos recebidos pela Fiocruz (BS-424, BS-414, BS-423 e BS-422) foram escolhidos, pois optou-se por trabalhar com os microrganismos conhecidos, haja vista que os mesmos apresentaram crescimento e estão presentes em diversas publicações de trabalhos de autocicatrização em materiais de base cimentícia (DE MUYNCK et al., 2008a, DE MUYNCK et al., NOSOUHIAN; MOSTOFINEJAD; HASHEMINEJAD, 2015, 2008b; JAGANNATHAN et al., 2018; VAN TITTELBOOM et al., 2010; WANG et al., 2012, 2010, 2014). Os 6 restantes foram escolhidos em ordem decrescente de crescimento até se completar a classificação dos 10 microrganismos. A Figura 30 mostra a ordem de classificação do primeiro até o décimo microrganismo.

Apesar do *Bacillus megaterium* ser um dos microrganismos conhecidos e ter evidenciado bom funcionamento nos trabalhos de Achal et al. (2011) e Andalib et al. (2016), não houve crescimento quando aplicado no meio de cultura Caldo Nutriente após incubação em estufa a 30°C por 24 horas. O que mostra que o meio de cultura influencia no crescimento no microrganismo.

## 4.2 CONTAGEM MICROBIANA

Nesse item serão apresentados os resultados das contagens pela Diluição Seriada e pela contagem na Câmara de Neubauer. O resultado das amostras que foram submetidas ao espectrofotômetro será analisado nos itens subsequentes. As contagens, como apresentados nos itens 3.2.4.2 e 3.2.4.3 de Materiais e Métodos, foi realizada somente na amostra de *Lysinibacillus sphaericus* INCQS 422 (B-422).

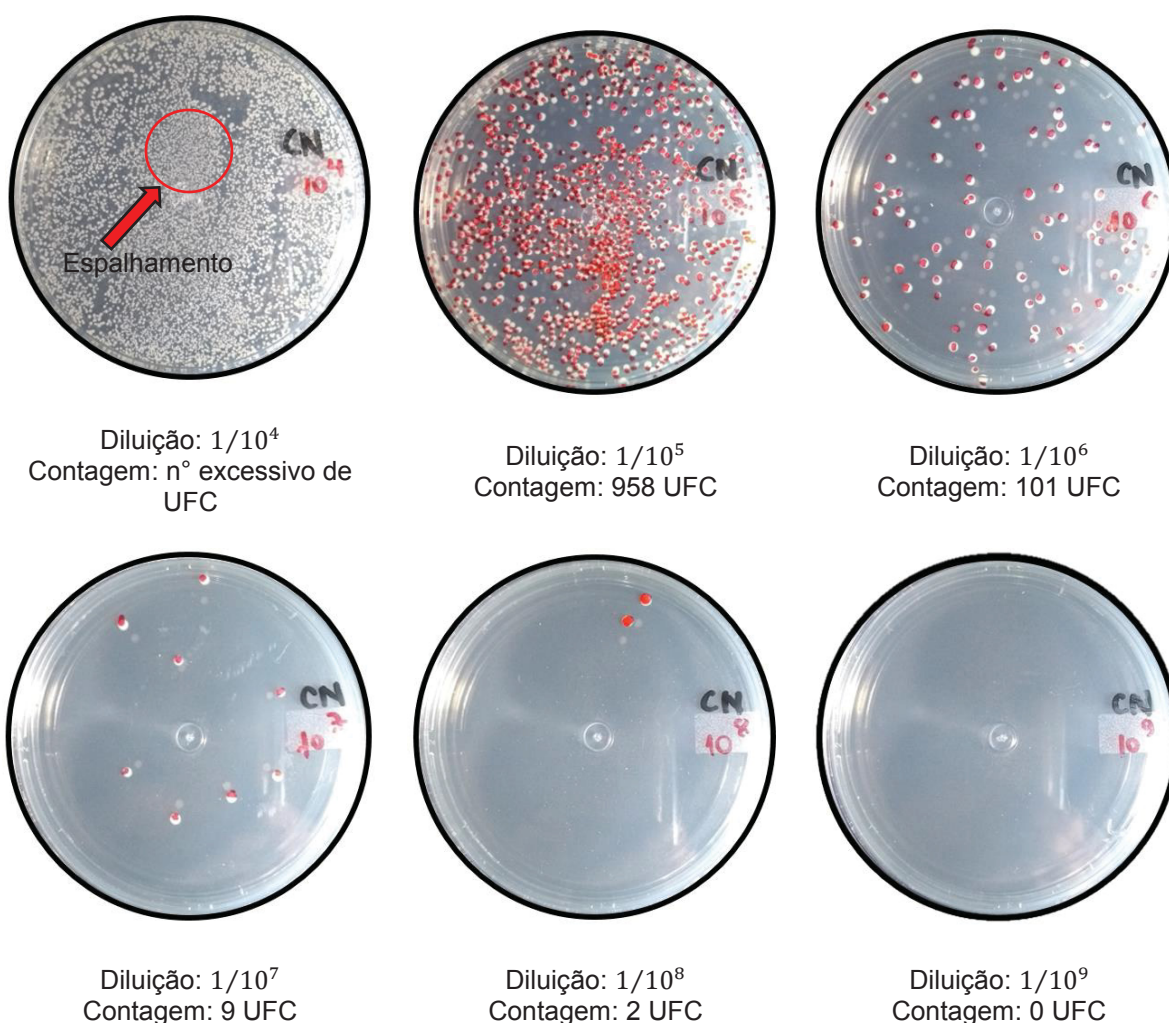
### 4.2.1 Diluição seriada - Contagem em placas (UFC/ml)

As contagens nas placas de Petri contendo somente Ágar Nutriente foram as que mais apresentaram Unidade de Formação de Colônia (UFC) do *Lysinibacillus sphaericus* INCQS-422 (B-422), haja vista que foi o único a apresentar crescimento na placa com diluição 1/10<sup>8</sup>, como apresenta a Figura 31. A placa com diluição 1/10<sup>4</sup> apresentou um número excessivo de UFC, o que impossibilitou a contagem devido ao espalhamento das colônias. As contagens

só foram possíveis de serem realizadas a partir da placa de diluição  $1/10^5$ , apresentando 958 UFC.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008), a contagem obtida deve estar entre 30 e 300 UFC, e a única placa que está no intervalo sugerido com meio de cultura Ágar Nutriente é a de diluição  $1/10^6$  que apresenta 101 UFC. Então, aplicando a Equação 11, tem-se para o microrganismo B-422 uma concentração de  $1,01 \times 10^8$  UFC/ml.

Figura 31 - Diluição Seriada: Placas de Ágar Nutriente



Fonte: O Autor

Jonkers e Schlangen (2007) trabalham com uma adição da ordem  $10^9$  células/cm<sup>3</sup> de argamassa. Essa concentração quando dada por volume do corpo de prova dificulta visualizar qual é a real concentração dos microrganismos

quando em meio de cultura, pois não se sabe qual o volume de amostra que foi necessário fazer para se coletar essa quantidade de microrganismos. Contudo, foram dadas as dimensões do corpo de prova (cp) utilizado (cp cilíndrico de 4 cm de diâmetro e 1 cm de altura), com isso foi possível calcular o volume, que foi de 12,57 cm<sup>3</sup>/cp e estimar qual a quantidade de células por corpo de prova (12,57 cm<sup>3</sup>/cp x 10<sup>9</sup> células/cm<sup>3</sup> = 1,257 x 10<sup>10</sup> células/cp). Logo, para o presente trabalho, tem-se a ordem de 10<sup>8</sup> células/ml, então o volume necessário para conseguir a quantidade de células por cp do trabalho de Jonkers e Schlangen (2007) é de aproximadamente 125 ml de amostra. Essas quantidades de microrganismos podem ser coletadas por centrifugação e transferidas para um meio que seja compatível em volume para aplicação no cp adotado.

A Tabela 9 apresenta o resumo das contagens. As imagens que apresentam os crescimentos das colônias nas placas de Petri com os seus respectivos meios de culturas estão no Apêndice II. O meio de cultura que teve o maior número de unidade formadora de colônia, analisando a média e o indicado pela Anvisa (2008) foi o meio com Cloreto de Cálcio.

Tabela 9 - Contagem: Unidade de Formação de Colônias (UFC/ml) para microrganismo B-422 em Ágar Nutriente

| Diluição               | Ágar Nutriente (UFC)   | Ágar Nutriente + Lactato de Cálcio (UFC) | Ágar Nutriente + Nitrato de Cálcio (UFC) | Ágar Nutriente + Cloreto de Cálcio (UFC) | Ágar Nutriente + Acetato de Cálcio (UFC) |
|------------------------|------------------------|--|--|--|--|
| 1/10 <sup>4</sup>      | n° excessivo de UFC    | n° excessivo de UFC                      | n° excessivo de UFC                      | n° excessivo de UFC                      | 0  |
| 1/10 <sup>5</sup>      | 958                    | 569                                      | 766                                      | n° excessivo de UFC                      | 0  |
| 1/10 <sup>6</sup>      | 101                    | 545                                      | 96                                       | 203                                      | 0  |
| 1/10 <sup>7</sup>      | 9                      | 9  | 12                                       | 22                                       | 0  |
| 1/10 <sup>8</sup>      | 2                      | 0  | 0  | 0  | 0  |
| 1/10 <sup>9</sup>      | 0                      | 0  | 0  | 0  | 0  |
| <b>Média (UFC/ml)</b>  | 1,22 x 10 <sup>8</sup> | 2,31 x 10 <sup>8</sup>                   | 9,75 x 10 <sup>7</sup>                   | 2,12 x 10 <sup>8</sup>                   | -  |
| <b>Adotar (UFC/ml)</b> | 1,01 x 10 <sup>8</sup> | 0,90 x 10 <sup>8</sup>                   | 0,96 x 10 <sup>8</sup>                   | 2,03 x 10 <sup>8</sup>                   | -  |

Fonte: O Autor

As placas com o meio Ágar Nutriente + Acetato de Cálcio não apresentaram crescimento em nenhum fator de diluição. Por esse motivo, o



experimento foi repetido para verificar a consistência do dado, porém também não houve crescimento para a segunda bateria de experimento.

#### 4.2.2 Câmara de Neubauer

A Tabela 10 apresenta as contagens do microrganismo B-422 na câmara de Neubauer. A ordem do número de células para todos os meios de cultura foi de ( $10^8$ ) variando de  $1,23 \times 10^8$  (Caldo Nutriente + Cloreto de Cálcio) até  $6,86 \times 10^8$  (Caldo Nutriente).

Tabela 10 - Soma dos quadrantes da Câmara de Neubauer e concentração de microrganismos por ml da amostra

| Contagem  | Caldo Nutriente    | Caldo Nutriente + Lactato de Cálcio | Caldo Nutriente + Nitrato de Cálcio | Caldo Nutriente + Cloreto de Cálcio | Caldo Nutriente + Acetato de Cálcio |
|---|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Q1</b>   | 656                | 53                                  | 95                                  | 28                                  | 51                                  |
| <b>Q2</b>   | 370                | 56                                  | 77                                  | 74                                  | 58                                  |
| <b>Q3</b>   | 169                | 61                                  | 107                                 | 42                                  | 74                                  |
| <b>Q4</b>   | 97                 | 78                                  | 108                                 | 49                                  | 42                                  |
| <b>Q5</b>   | 79                 | 74                                  | 78                                  | 52                                  | 80                                  |
| <b>n° de células por <math>\mu</math>L da amostra</b> | $6,86 \times 10^5$ | $1,61 \times 10^5$                  | $2,33 \times 10^5$                  | $1,23 \times 10^5$                  | $1,53 \times 10^5$                  |
| <b>n° de células por mL da amostra</b>                | $6,86 \times 10^8$ | $1,61 \times 10^8$                  | $2,33 \times 10^8$                  | $1,23 \times 10^8$                  | $1,53 \times 10^8$                  |

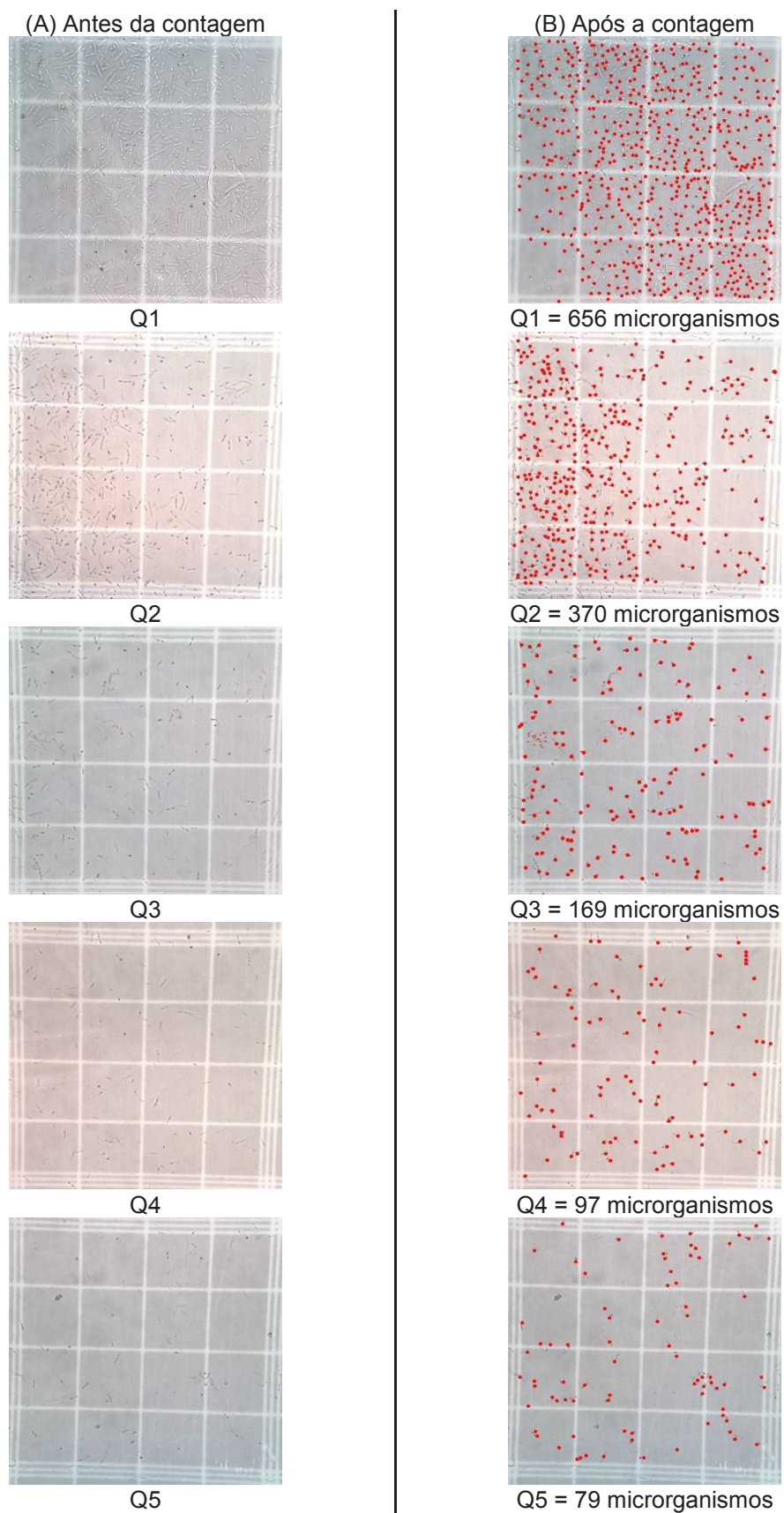
Fonte: O Autor

Os resultados das duas últimas linhas de respostas da Tabela 10 são oriundos da aplicação da Equação 12, pois estas respostas dependem de um fator de conversão e do fator de diluição da amostra no ensaio. Observa-se que em meios com concentração de cálcio a tendência é de diminuir a concentração da amostra em aproximadamente 3 vezes.

Os resultados das contagens feitas na câmara de Neubauer do microrganismo B-422 no meio de cultura Caldo Nutriente são representadas pela Figura 32. Observe que as indicações de Q1 a Q5 representam os quadrantes da diagonal do quadrado central, no qual cada quadrante conterá uma certa quantidade de microrganismos que deve ser contabilizada e somada no final da contagem dos cinco quadrantes Q.



Figura 32 - Contagem pela Câmara de Neubauer. Meio de cultura Caldo Nutriente



Fonte: O Autor

Esse tipo de contagem fornece uma quantidade precisa de microrganismos, pois com este método o levantamento é contabilizado célula por célula através de um microscópio de bancada. Já no método da diluição seriada se presume que a colônia que cresceu na placa se originou de uma única célula, o que pode não ser verdade.

No trabalho de Jonkers et al. (2010) foram adicionados microrganismos na ordem de 1 a  $10 \times 10^8/\text{cm}^3$  de pasta de cimento, no qual foram utilizados corpos de prova (cp) cúbicos de 4 cm x 4 cm x 4 cm. Calculando o volume do cp e multiplicando pela concentração tem-se a quantidade de células aplicadas por cp. Para a concentração de  $10^8$  células/ $\text{cm}^3$  de pasta, para o presente trabalho há a necessidade de realizar uma quantidade de aproximadamente 64 ml de meio de cultura, e para concentração de  $10^9$  células/ $\text{cm}^3$  de pasta aproximadamente 640 ml. Essas quantidades de microrganismos podem ser coletadas por centrifugação.

#### 4.3 ANÁLISE POR GRUPO DE REAGENTES

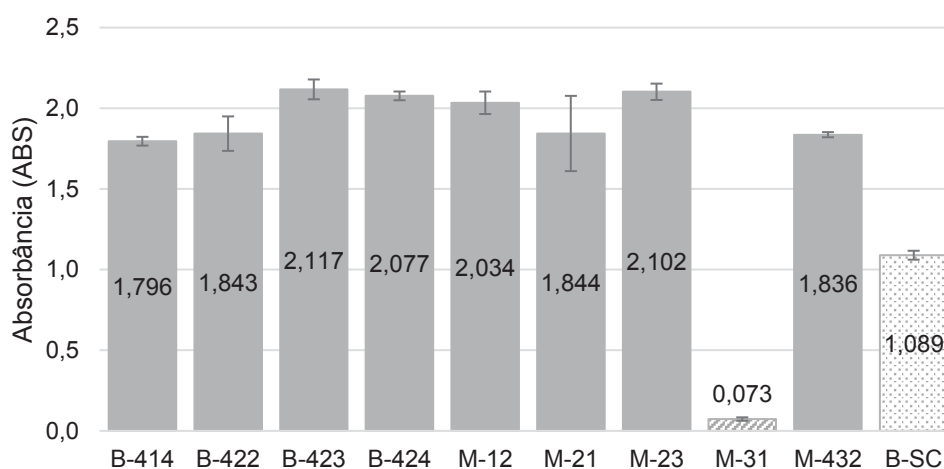
Essa análise consiste na comparação dos 10 microrganismos variando os grupos de reagentes. Para o controle do experimento foi realizado um grupo sem a adição de microrganismos para verificar se a precipitação dos minerais realmente se originava devido à presença dos microrganismos ou se elas se originaram de uma possível reação química dos reagentes quando expostos às diferentes situações experimentais. Por fim, não houve depósito de minerais para as amostras de controle, o que sugere que os precipitados minerais são originados dos microrganismos expostos aos diferentes reagentes à base de cálcio.

Um dos objetivos desse experimento é efetuar a coleta do mineral precipitado no meio de cultura. Logo, o procedimento experimental ocorreu conforme o item 3.2.5, ou seja, os dados coletados dos grupos dos itens 4.3.1 a 4.3.5 foram submetidos a 14 dias de incubação em uma estufa de agitação a 100 rpm e temperatura de 30°C. Sendo assim, há diferenças entre as leituras de absorbância entre os dados da Figura 30, que foram coletados após 24 horas de incubação, para os coletados nos itens seguintes.

#### 4.3.1 Caldo Nutriente

O crescimento dos microrganismos no meio de cultura Caldo Nutriente sem a presença de reagentes à base de cálcio estão apresentados na Figura 33. As bactérias *Lysinibacillus sphaericus* (B-414, B-422, B-423 e B-424) obtiveram crescimento estatisticamente iguais aos microrganismos marinhos M-12, M-21, M-23 e M-432. O teste utilizado para a comparação múltipla entre médias foi o Teste de Tukey, os dados estatísticos encontram-se no Apêndice III. Já o microrganismo marinho M-31 foi o que apresentou menor crescimento e foi estatisticamente diferente a todas as amostras, o *Bacillus subtilis* e o *Bacillus cereus* (B-SC) foi o que possuiu o segundo menor desempenho neste meio de cultura e foi estatisticamente diferente a todos os outros microrganismos do grupo.

Figura 33 - Leitura da Absorbância (ABS) dos microorganismo na presença do meio de cultura Caldo Nutriente



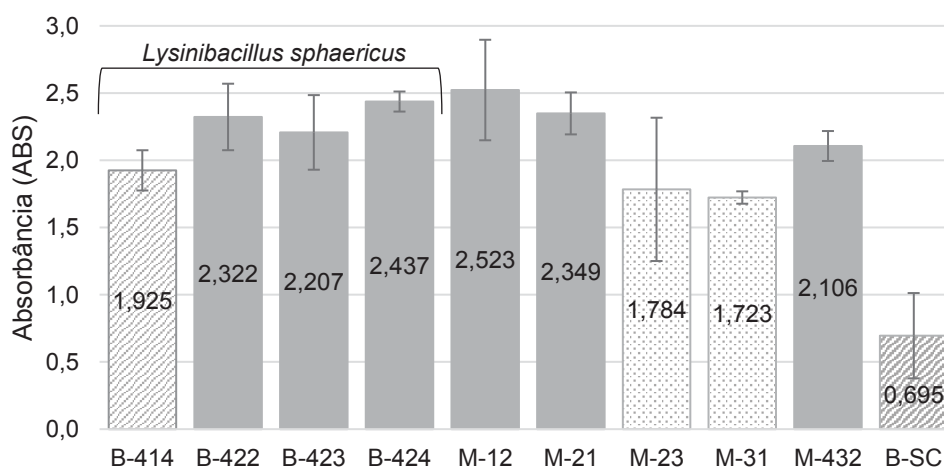
Fonte: O Autor

Para este meio de cultura não foi possível efetuar a coleta de amostras de precipitação, ou seja, mesmo com um crescimento acentuado, os microrganismos não foram capazes de precipitar minerais à base de cálcio. Este fato reforça a importância de se utilizar reagente para induzir a precipitação dos minerais no meio de cultura. Como não foi possível realizar a coleta de material precipitado para este grupo experimental não foram feitas as análises de Difractometria de Raio-X (DRX) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

#### 4.3.2 Caldo Nutriente + Lactato de Cálcio

O crescimento dos microrganismos quando submetidos ao meio de cultura com adição de Lactato de Cálcio é mostrado na Figura 34. Avaliando os microrganismos *Lysinibacillus sphaericus* o único que apresentou diferença significativa em relação aos demais foi o B-414, já o que apresentou maior crescimento e menor variabilidade foi o B-424. Em relação ao grupo dos microrganismos marinhos, os que apresentaram maior crescimento foram os M-12, M-21 e M-432, esses apresentaram crescimento estatisticamente igual.

Figura 34 - Leitura da Absorbância (ABS) dos microrganismo na presença do meio de cultura Caldo Nutriente com adição de Lactato de Cálcio



Fonte: O Autor

As bactérias *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* (B-SC) foram as que apresentaram menor crescimento do grupo que foi submetido à presença do Lactato de Cálcio. Porém, isso não significa que o microrganismo não contribua para a formação de carbonatos no meio. Observe na Figura 35 a contribuição de precipitado do microrganismo M-432 (leitura média de 2,106 ABS) em comparação com o B-SC (leitura média de 0,695), coerentemente o B-SC obteve um menor volume de precipitado coletado.

Figura 35 - Amostras de precipitado dos microrganismos M-432 e B-SC



Fonte: O Autor

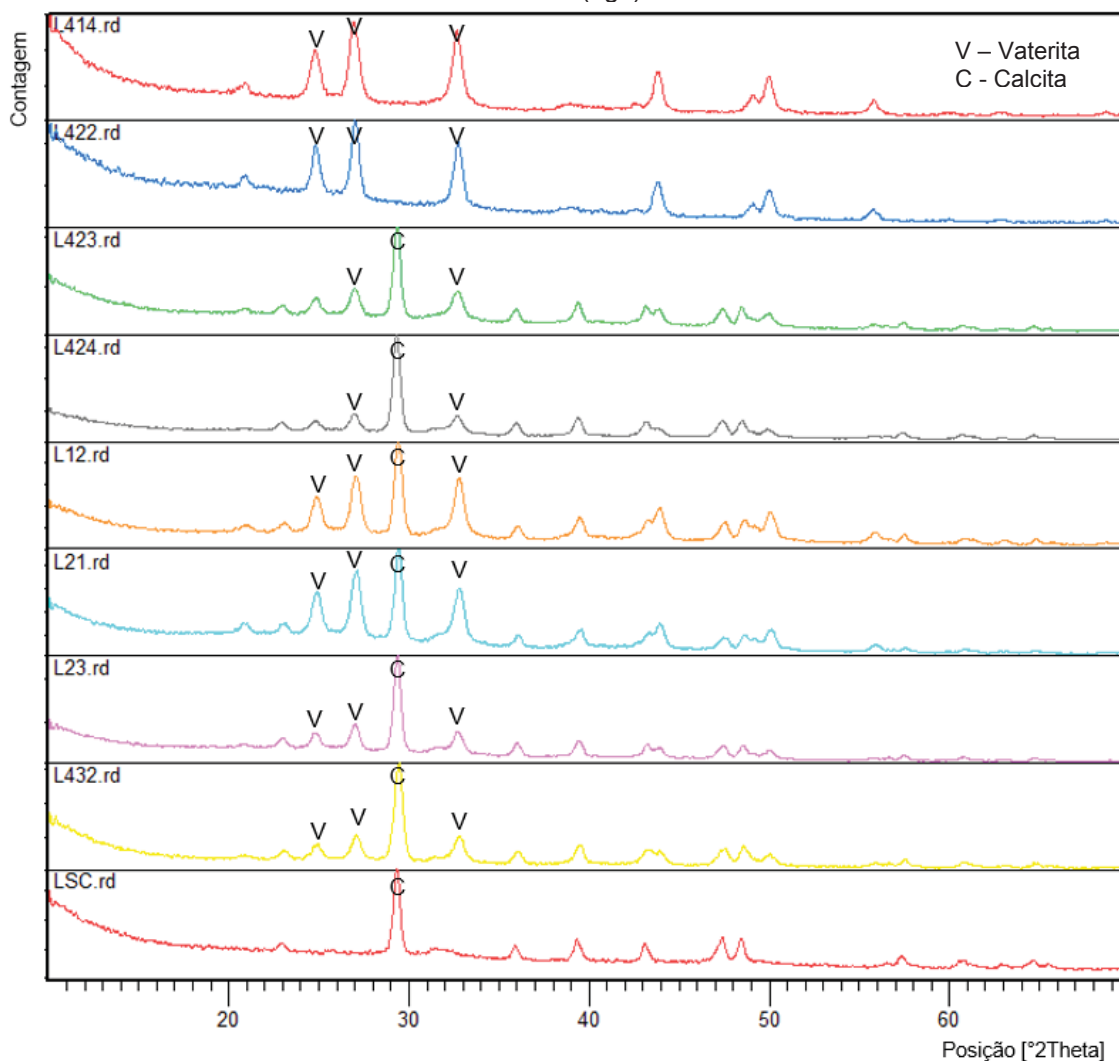
Foi constatado que a presença do reagente foi fundamental para a precipitação dos minerais, pois os microrganismos sem a presença do reagente não apresentaram precipitação como foi visto no item 4.3.1. Isso mostra que somente o crescimento do microrganismo não significa que ele vai precipitar carbonato de cálcio.

Com a exceção do microrganismo marinho M-31, todos os demais na presença do reagente Lactato de Cálcio proporcionaram a coleta de material precipitado para o ensaio de DRX e MEV. Na Figura 36 são apresentados os nove difratogramas dos ensaios de DRX dos precipitados das amostras. Observe que em todos os casos foram constatados a presença do composto carbonato de cálcio, seja na forma de vaterita ou na de calcita.

A vaterita e a calcita possuem formas e volumes diferentes e sabe-se que a vaterita se transforma em calcita pelo simples contato com água em temperatura ambiente ou por aquecimento sob ar (NASSRALLAH-ABOUKAÏS et al., 2003).

A precipitação do composto químico carbonato de cálcio pode ser denominada como biomineralização ou biocalcificação do meio. No trabalho de Ercole et al. (2007) foi utilizado o microrganismo *Bacillus sphaericus* (o mesmo *Lysinibacillus sphaericus*) como agente de calcificação para restaurações de monumentos e construções históricas, e assim como neste presente trabalho o carbonato de cálcio foi encontrado como mineral precipitado. Porém, os autores não especificam qual a linhagem do *B. sphaericus*, fato que impossibilita a replicação do experimento como via de confirmação de dados.

Figura 36 - Difração de Raios-X dos microrganismos com a adição do reagente Lactato de Cálcio (5g/l)



Fonte: O Autor

Os minerais vaterita e calcita são o mesmo composto químico, na Tabela 11 seguem as informações do mineral identificado no DRX.

Tabela 11 - Compostos identificados do precipitado dos microrganismos (Lactato de Cálcio)

| Código de Referência <sup>10</sup> | Nome do Composto    | Fórmula Química   | Mineral  |
|------------------------------------|---------------------|-------------------|----------|
| 33-0268                            | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Vaterita |
| 47-1743                            | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Calcita  |

Fonte: O Autor

<sup>10</sup> Banco de Dados cristalográficos da *International Center for Diffraction Data* (ICDD) de 2003.

O microrganismo *Lysinibacillus sphaericus* INQCS-414 utilizado nesta pesquisa foi o mesmo que o utilizado por Shirakawa et al. (2011) e em ambos os trabalhos esse micróbio só precipitou o mineral vaterita. No trabalho citado o meio de cultura no qual o B-414 foi exposto foi à base de caldo nutriente, bicarbonato de sódio, ureia e cloreto de cálcio. Ainda no trabalho de Shirakawa et al. (2011), importante destacar que o B-414 passou por 12 dias de incubação em estufa de agitação à 100 rpm e temperatura de 28°C e apresentou alta precipitação consumindo 74% dos íons cálcio do meio. Uma crítica que pode ser colocada em um dos itens desse trabalho é adicionar a ureia como fonte nutricional, haja vista que no presente trabalho foi feito o teste de hidrólise da ureia nesse microrganismo e nos demais e todos deram urease negativa, ou seja, os mesmos não possuem a enzima urease capaz de hidrolisar a ureia, no Apêndice IV encontra-se o procedimento realizado e os resultados.

Todos os quatro microrganismos marinhos apresentaram precipitação de carbonato de cálcio de acordo com os difratogramas da Figura 36. No trabalho de Sánchez-Román et al. (2007) foram utilizados dezenove microrganismos halofílicos<sup>11</sup>, no qual precipitam carbonatos de cálcio.

O difratograma do microrganismo B-SC (Figura 36) apresenta um pico de calcita, ou seja, sugere que são passíveis de promoverem a calcificação do meio. Fato que corrobora com o trabalho de Boquet, Boronat e Ramos-Cormenzana (1973) que isolaram 210 microrganismos para formarem cristais de calcita em placas e dentre esses estavam o *Bacillus subtilis* e o *Bacillus cereus*.

No presente trabalho, as imagens por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos microrganismos que foram submetidos à presença do Lactato mostram indícios da formação dos minerais de carbonato de cálcio. Na Figura 37 são apresentadas as imagens (A), (B) e (C) do microrganismo B-414 na presença do reagente Lactato de Cálcio, na qual a primeira (A) está com aumento de 400 vezes, a segunda (B) com aumento de 5 mil vezes e a terceira (C) com aumento de 10 mil vezes. Sugere-se que as imagens sejam de cristais

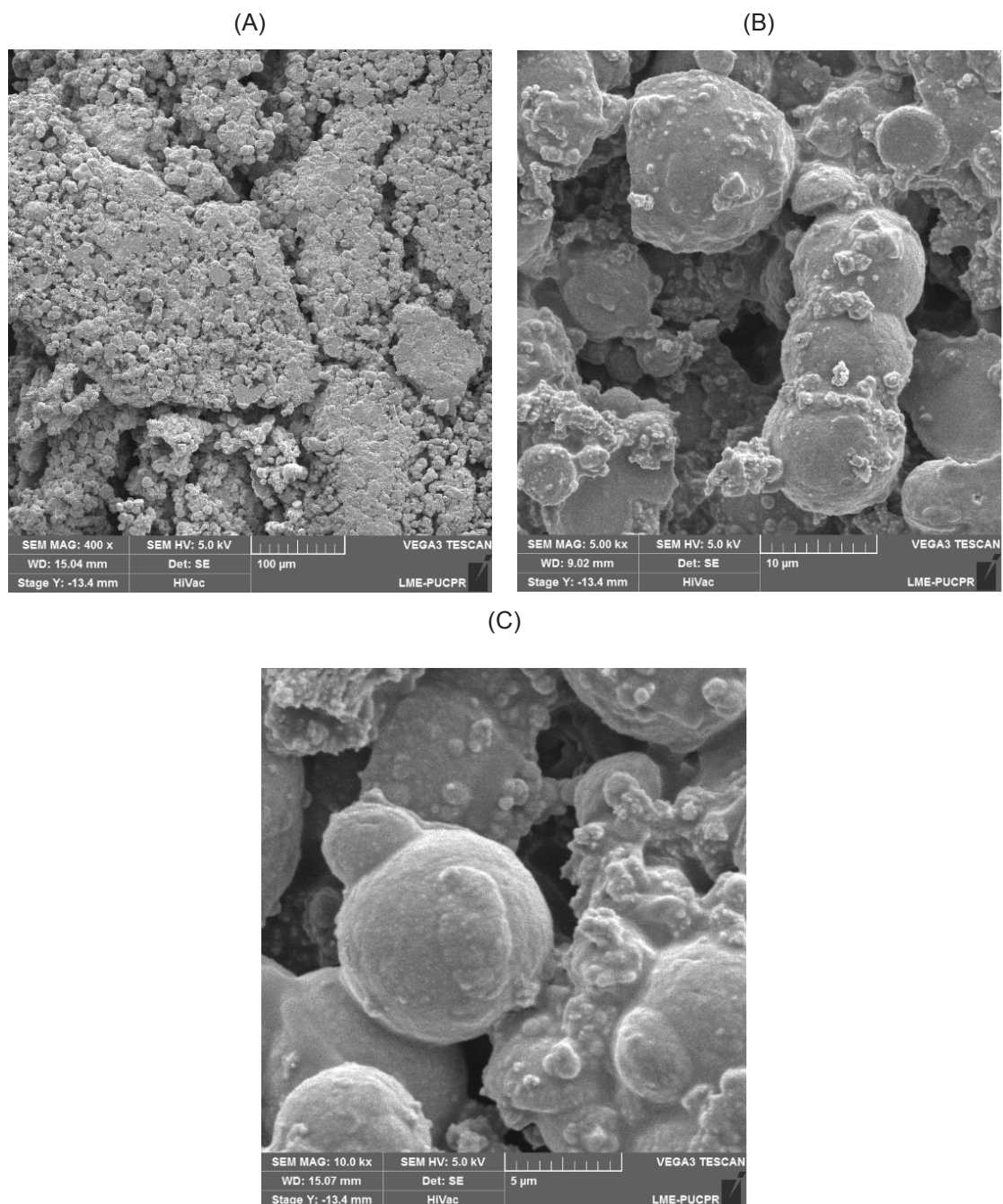
---

<sup>11</sup> São microrganismos que necessitam estar em ambiente com alta concentração de sais para se desenvolver.



de vaterita, visto que nos ensaios de DRX foi o único mineral encontrado na amostra precipitada.

Figura 37 - MEV do precipitado do microrganismo B-414 quando exposto ao reagente Lactato de Cálcio



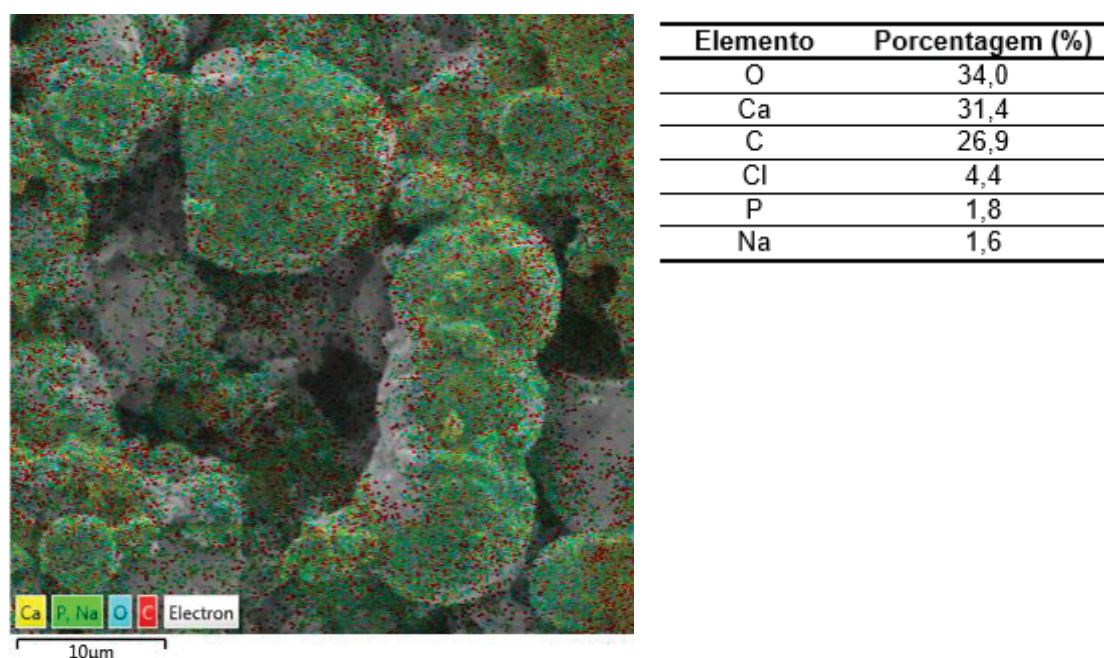
Fonte: O Autor

No Apêndice VI estão as imagens dos demais precipitados dos microrganismos para consulta.



Aliada às imagens de MEV foram feitas as leituras de Espectroscopias de Energia Dispersiva (EDS) a fim de verificar quais os elementos presentes na amostra. Na Figura 38 é apresentado o EDS da imagem de MEV, mesma imagem da Figura 37 (B). Observe que os elementos predominantes na amostra são o oxigênio com 34,0%, depois o cálcio com 31,4% e em terceiro o carbono com 26,9%. Esses elementos corroboram com a hipótese de que o precipitado seja de carbonato de cálcio, visto que sua composição é formada por esses três elementos ( $\text{CaCO}_3$ ).

Figura 38 - Imagem de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) do microrganismo B-414 na presença de Lactato de Cálcio



Fonte: O Autor

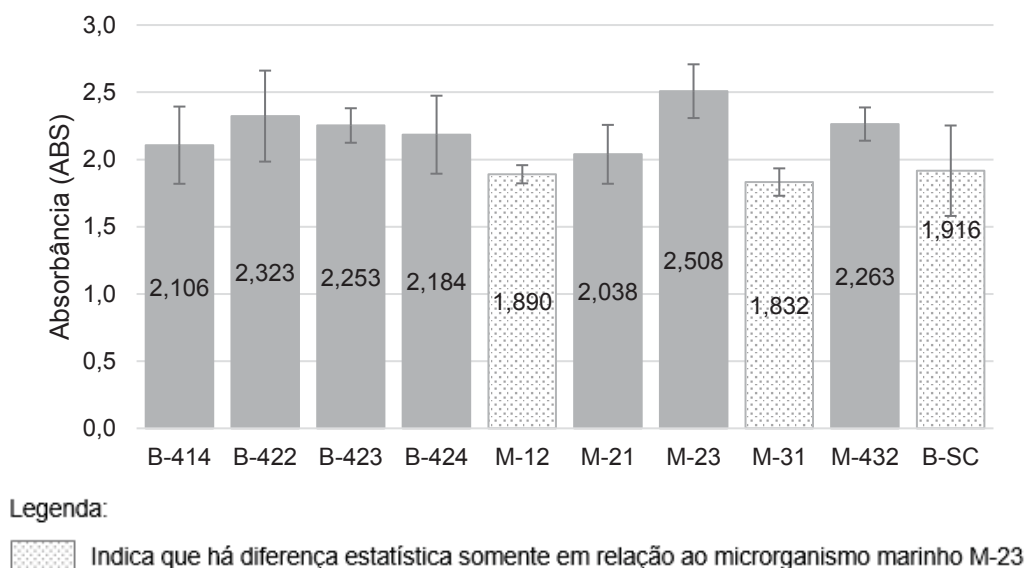
Jonkers e Schlangen (2009) utilizam o composto químico Lactato de cálcio como fonte nutricional e como conversor metabólico para os microrganismos converterem esse mineral orgânico em calcita. A utilização desse composto é uma alternativa para microrganismos que não hidrolisam ureia precipitar minerais à base de cálcio (JONKERS et al., 2010).

Sierra-beltran, Jonkers e Schlangen (2014) e Wiktor e Jonkers (2011) também utilizam o lactato como fonte nutricional e para conversão do mineral orgânico em calcita para reparos em estruturas de concreto e os resultados foram satisfatórios.

#### 4.3.3 Caldo Nutriente + Nitrato de Cálcio

As quatro linhagens dos microrganismos *Lysinibacillus sphaericus* apresentaram crescimento estatisticamente iguais, Figura 39. Os microrganismos M-12, M-31 e B-SC apresentaram diferença estatística somente em relação ao microrganismo marinho M-23, porém em relação aos demais não apresentaram diferença estatística, ou seja, excluindo o M-23 todos os microrganismos da série são estatisticamente iguais. Os dados das leituras no espectrofotômetro encontram-se no Apêndice V e as análises estatísticas estão no Apêndice III para consulta.

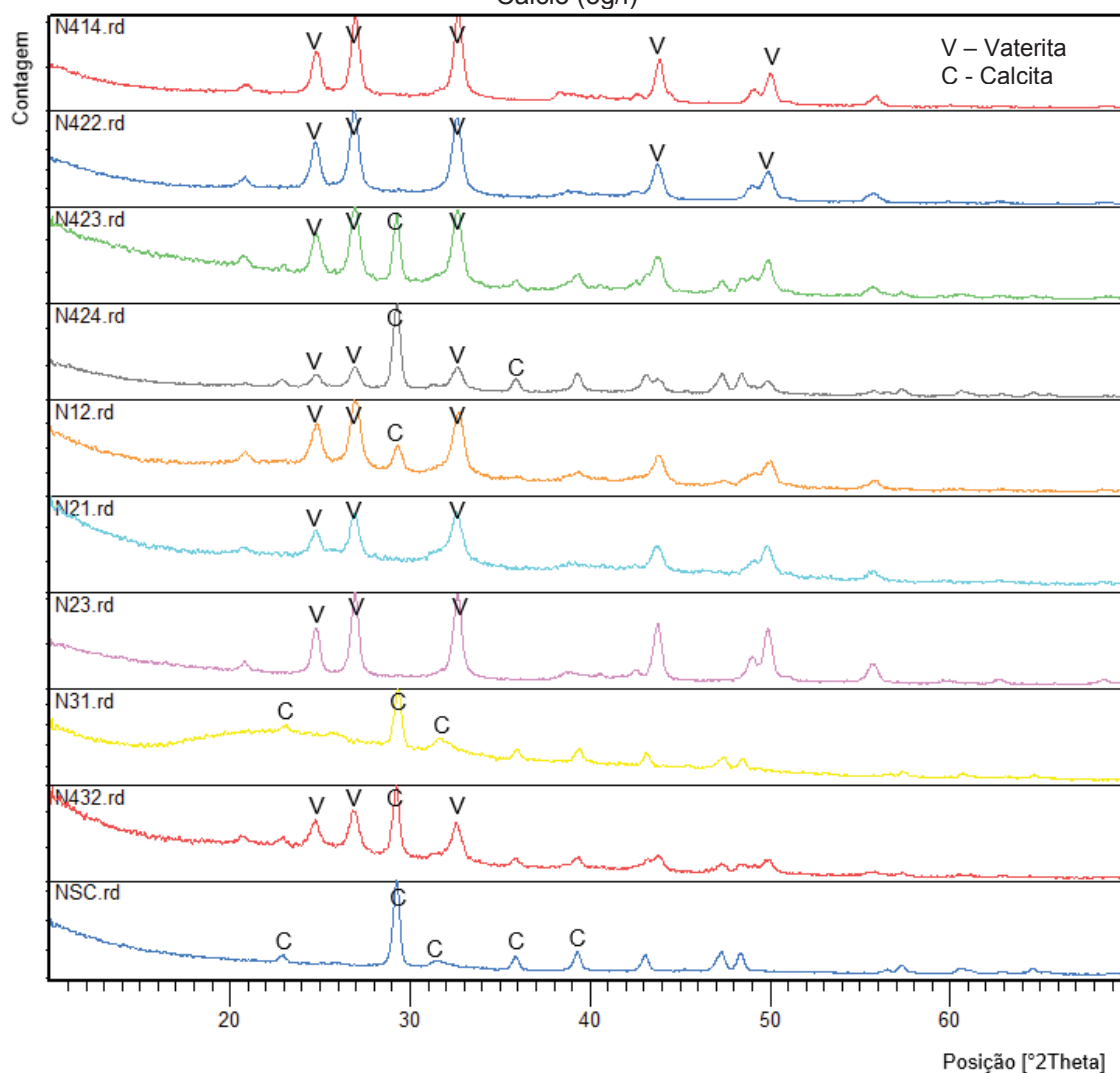
Figura 39 - Leitura da Absorbância (ABS) dos microrganismo na presença do meio de cultura Caldo Nutriente com adição de Nitrato de Cálcio



Fonte: O Autor

Para este meio de cultura foi possível efetuar a coleta do precipitado em todos os microrganismos para os ensaios de DRX e MEV. Os resultados do DRX para este grupo está representado na Figura 40. Os minerais encontrados no ensaio foram a vaterita e a calcita.

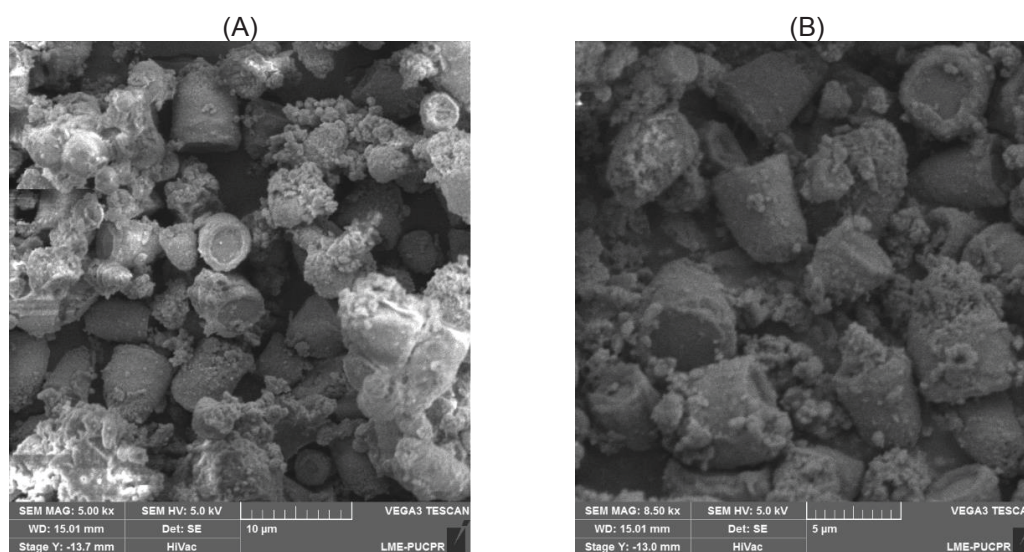
Figura 40 - Difração de Raios-X dos microrganismos com a adição do reagente Nitrato de Cálcio (5g/l)



Fonte: O Autor

Na Figura 41 são apresentadas as imagens (A) e (B) de Microscopia (MEV) para o microrganismo B-414 quando exposto ao reagente Nitrato de Cálcio. A imagem (A) está com aumento de 5 mil vezes e a imagem (B) com aumento de 8,5 mil vezes. Pela observação do precipitado sugere-se que sejam formações de minerais carbonato de cálcio.

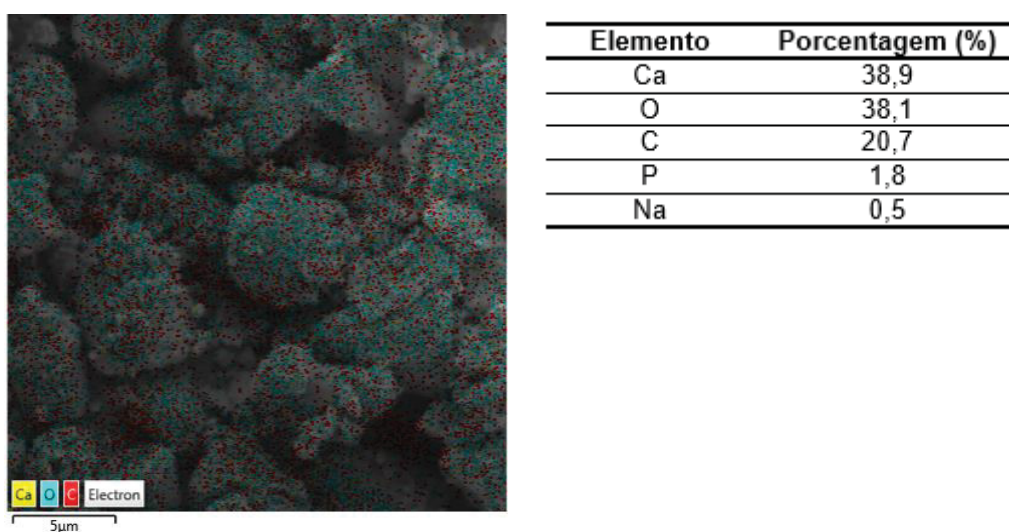
Figura 41 - MEV do precipitado do microrganismo B-414 quando exposto ao reagente Nitrato de Cálcio



Fonte: O Autor

A Figura 42 mostra o resultado do EDS para o microrganismo B-414 na presença do reagente Nitrato de Cálcio, e mais uma vez o resultado corrobora para a hipótese de que o composto precipitado por esse microrganismo seja o carbonato de cálcio, visto que a porcentagem dos elementos predominantes da amostra são o cálcio apresentando 38,9 %, em segundo o oxigênio com 38,1% e em terceiro o carbono com 20,7%.

Figura 42 - Imagem de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) do microrganismo B-414 na presença de Nitrato de Cálcio

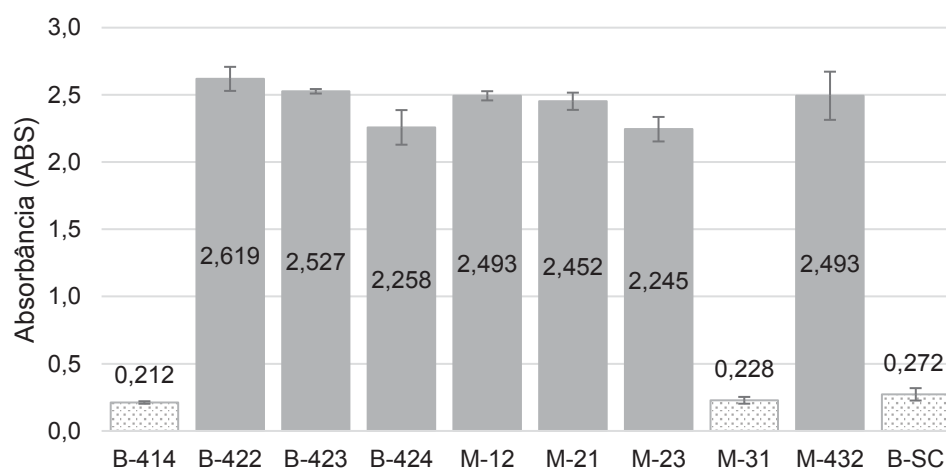


Fonte: O Autor

#### 4.3.4 Caldo Nutriente + Acetato de Cálcio

As médias e desvios padrões das leituras pelo espectrofotômetro estão representados na Figura 43. Os microrganismos B-414, M-31 e B-SC foram os que apresentaram menor crescimento neste grupo e são estatisticamente iguais, já os demais microrganismos apresentaram crescimento estatisticamente iguais.

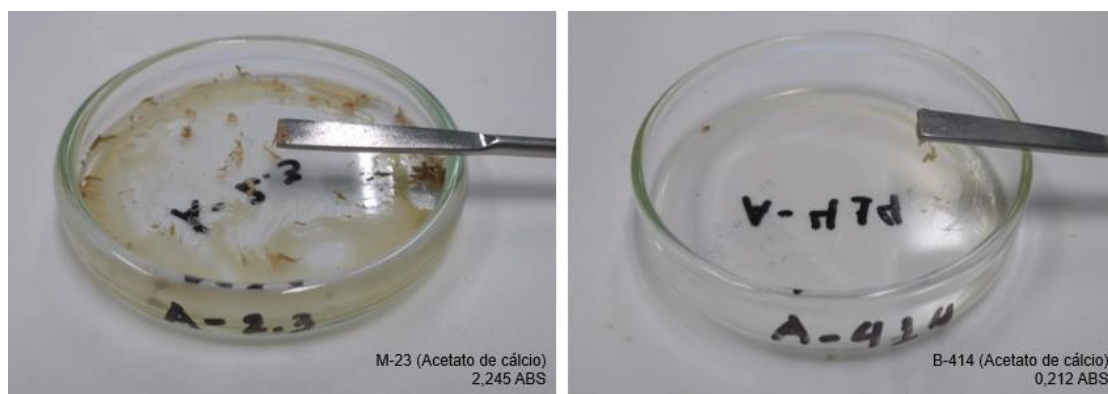
Figura 43 - Leitura da Absorbância (ABS) dos microrganismo na presença do meio de cultura Caldo Nutriente com adição de Acetato de Cálcio



Fonte: O Autor

Em relação à coleta de material precipitado para a execução do ensaio de DRX e MEV os microrganismos B-414 (0,212 ABS), M-23 (2,245 ABS), M-31 (0,228 ABS) e B-SC (0,272 ABS) não apresentaram material suficiente precipitado para a coleta, Figura 44. Observe que o crescimento do microrganismo M-23 foi superior em relação aos demais, porém somente o crescimento do microrganismo não é o suficiente se o mesmo não apresentar precipitação.

Figura 44 - Coleta do material precipitado. Microrganismos M-23 e B-414 (material insuficiente)

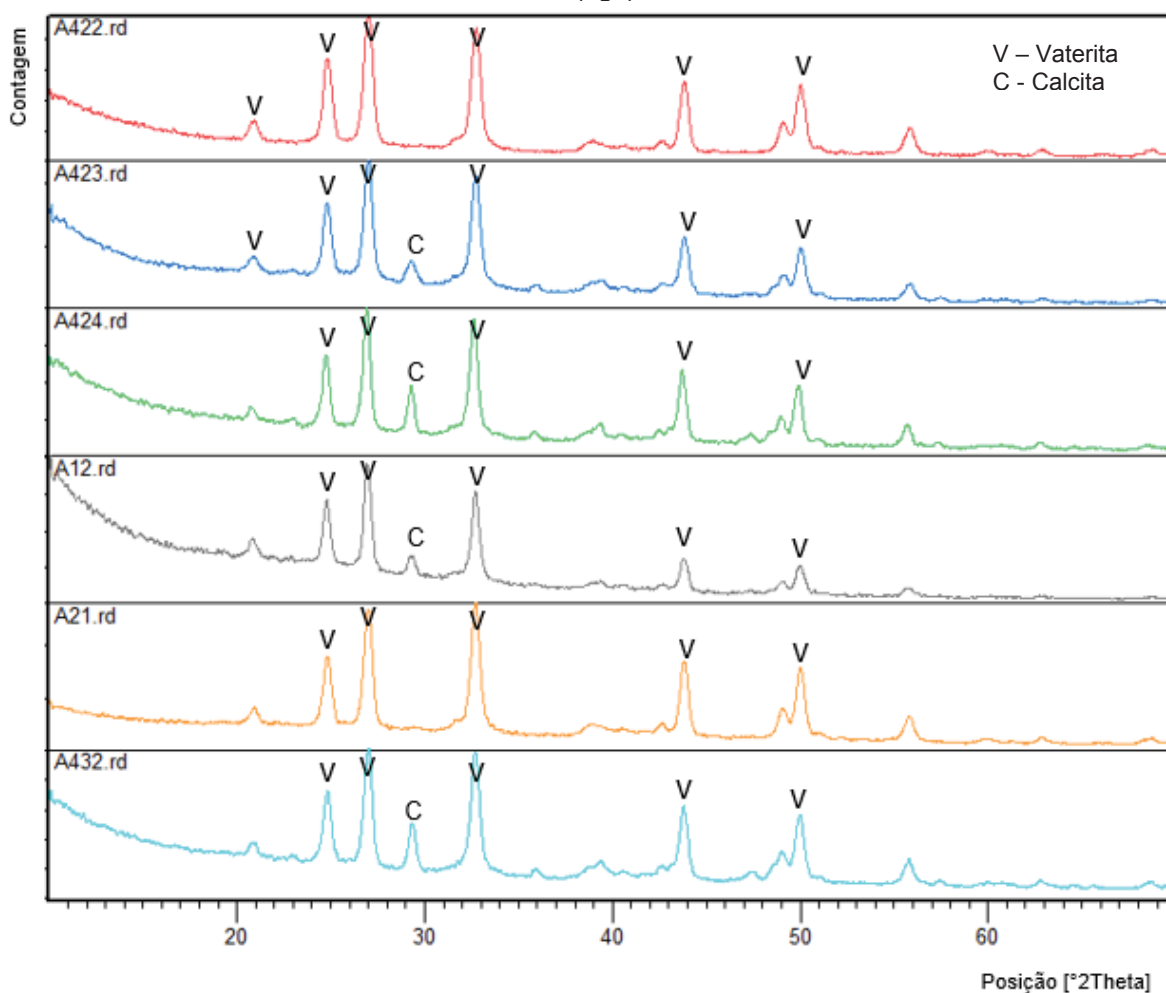


Fonte: O Autor

Sendo assim a Figura 45 apresenta 6 gráficos de DRX. Os minerais encontrados no ensaio foram a vaterita e a calcita, ou seja, composto de carbonato de cálcio.

Na Figura 46 são apresentadas as imagens do MEV feitas no microrganismo B-422. As imagens estão aumentadas em 5 mil vezes (esquerda) e em 10 mil vezes (direita). Observe nas imagens que há a formação de compostos com características de carbonatos de cálcio (vaterita).

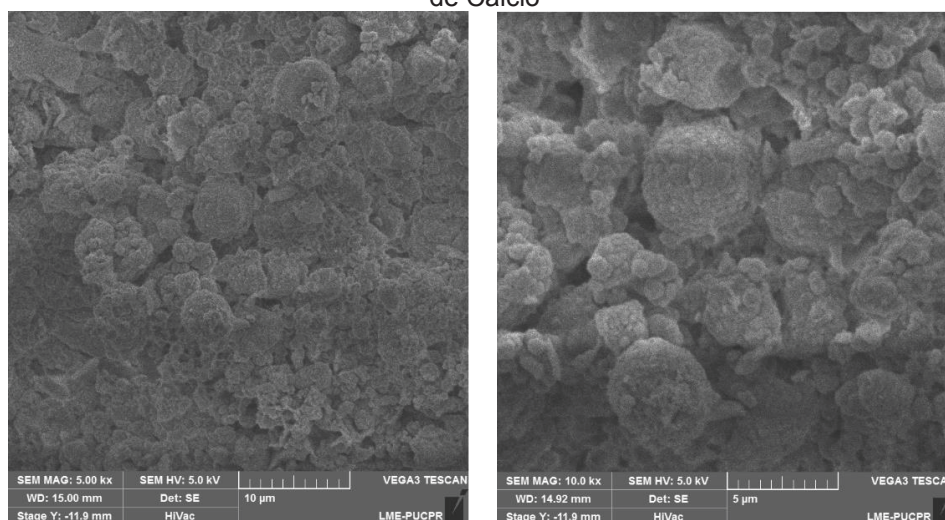
Figura 45 - Difração de Raios-X dos microrganismos com a adição do reagente Acetato de Cálcio (5g/l)



Fonte: O Autor



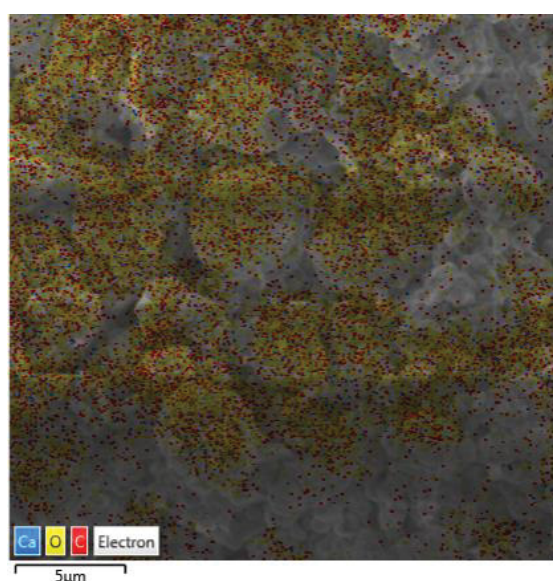
Figura 46 - MEV do precipitado do microrganismo B-422 quando exposto ao reagente Acetato de Cálcio



Fonte: O Autor

Através da imagem à direita da Figura 46 foi gerado o EDS para verificar os elementos que fazem parte do meio de cultura. Na Figura 47 é apresentado o EDS com os seguintes elementos principais: cálcio com 51,1%, em segundo o oxigênio com 35,1%, em terceiro o carbono com 12,4%. Os elementos presentes na amostra reforçam a hipótese de que o meio precipitado seja o carbonato de cálcio devido à sua composição química que depende dos três primeiros elementos encontrados nesse ensaio ( $\text{CaCO}_3$ ).

Figura 47 - Imagem de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) do microrganismo B-422 na presença de Acetato de Cálcio



| Elemento | Porcentagem (%) |
|----------|-----------------|
| Ca       | 51,1            |
| O        | 35,1            |
| C        | 12,4            |
| P        | 1,4             |

Fonte: O Autor

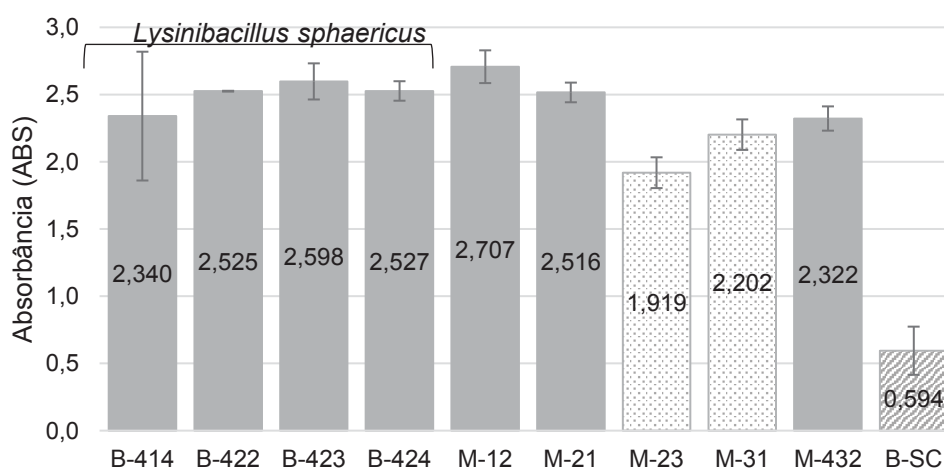


#### 4.3.5 Caldo Nutriente + Cloreto de Cálcio

Na Figura 48 são apresentadas as médias e seus respectivos desvios padrões das leituras pelo espectrofotômetro para os microrganismos que foram submetidos ao reagente à base de Cloreto de Cálcio. Analisando somente os microrganismos *Lysinibacillus sphaericus* não houve diferença significativa. O microrganismo que apresentou menor crescimento foi o B-SC, apresentando diferença significativa para todos os outros microrganismos do grupo.

Avaliando o crescimento dentro do grupo dos microrganismos marinhos, o M-12 apresentou diferença significativa em relação aos microrganismos M-23 e M-31, já esses dois são iguais estatisticamente. Ainda dentro da análise dos microrganismos marinhos os microrganismos M-12, M-21 e M-432 apresentam-se crescimentos estatisticamente iguais. Quando a análise é em relação ao microrganismo M-21 o mesmo apresenta diferença significativa quando comparado com o M-23 e diferença não significativa em relação ao M-31. Logo, quando a análise é em relação ao microrganismo M-432 o mesmo é igual estatisticamente aos microrganismos M-12, M-21, M-23 e M-31.

Figura 48 - Leitura da Absorbância (ABS) dos microrganismo na presença do meio de cultura Caldo Nutriente com adição de Cloreto de Cálcio



Fonte: O Autor

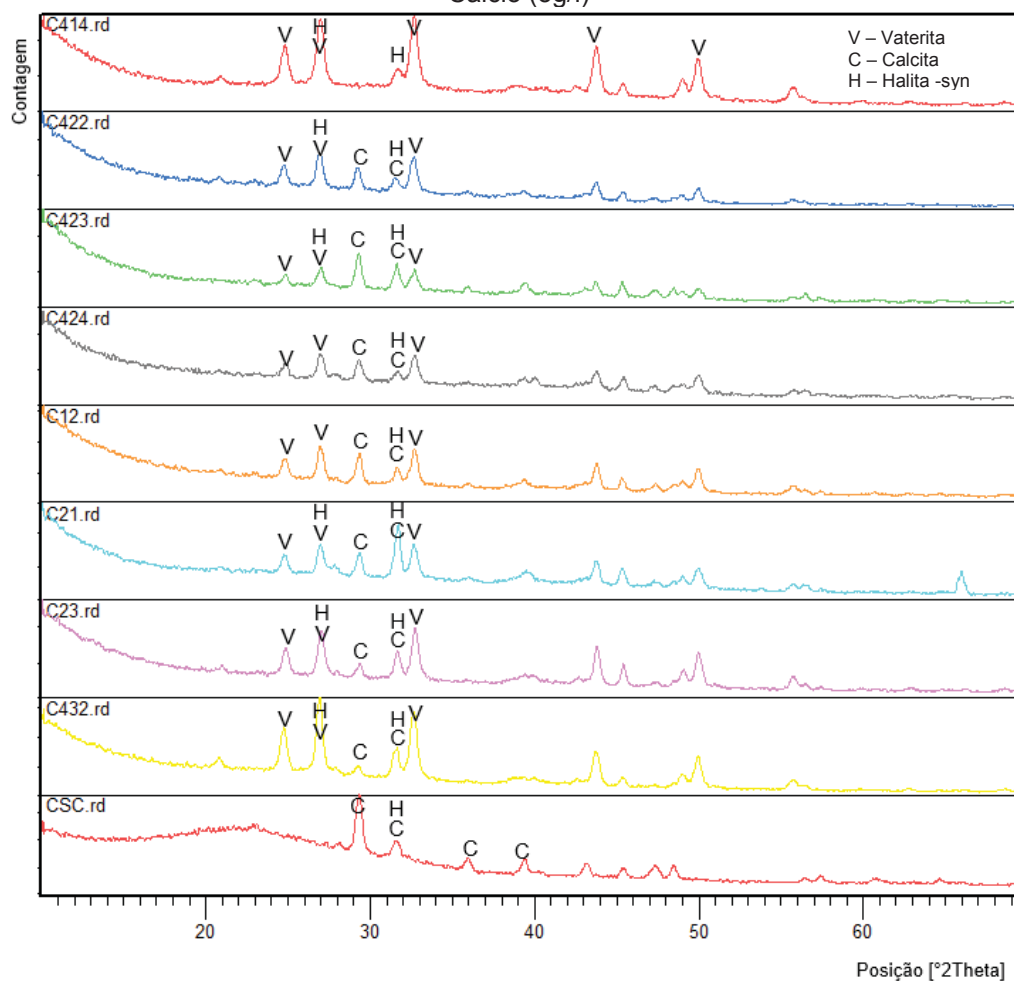
Os microrganismos B-422, B-423 e B-424 são estatisticamente diferentes aos microrganismos M-23 e B-SC e iguais estatisticamente aos B-414, M-12, M21 e M-432.

Em relação à coleta de amostras precipitadas para os ensaios de DRX e MEV, somente um microrganismo não apresentou sedimentação suficiente. Observe que o microrganismo que teve o menor crescimento foi o B-SC e o microrganismo que não apresentou sedimentação significativa para coleta foi o M-31, o que mostra que a precipitação do micróbio não tem relação direta com o crescimento. O microrganismo marinho M-31 só apresentou coleta satisfatória quando em contato com o reagente Nitrato de Cálcio.

No ensaio de DRX apresentado pela Figura 49 houve um novo mineral que não apareceu na presença dos outros reagentes, que foi a halita. Observe que para todos os gráficos do ensaio a halita se fez presente.

Na Tabela 12 são apresentadas as informações dos minerais sugeridos no ensaio do DRX. Para este grupo foram propostos três minerais: a halita, vaterita e calcita.

Figura 49 - Difração de Raio-X dos microrganismos com a adição do reagente Cloreto de Cálcio (5g/l)



Fonte: O Autor

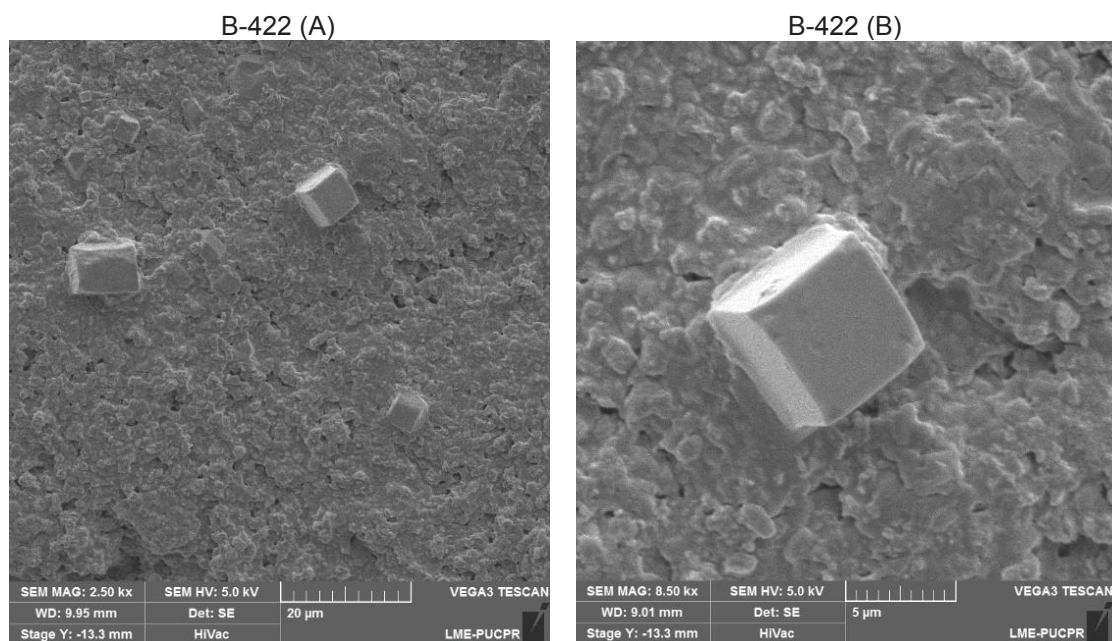
Tabela 12 - Compostos identificados do precipitado dos microrganismos (Cloreto de Cálcio)

| Código de Referência <sup>12</sup> | Nome do Composto    | Fórmula Química   | Mineral     |
|------------------------------------|---------------------|-------------------|-------------|
| 33-0268                            | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Vaterita    |
| 05-0628                            | Cloreto de Sódio    | NaCl              | Halita, syn |
| 47-1743                            | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Calcita     |

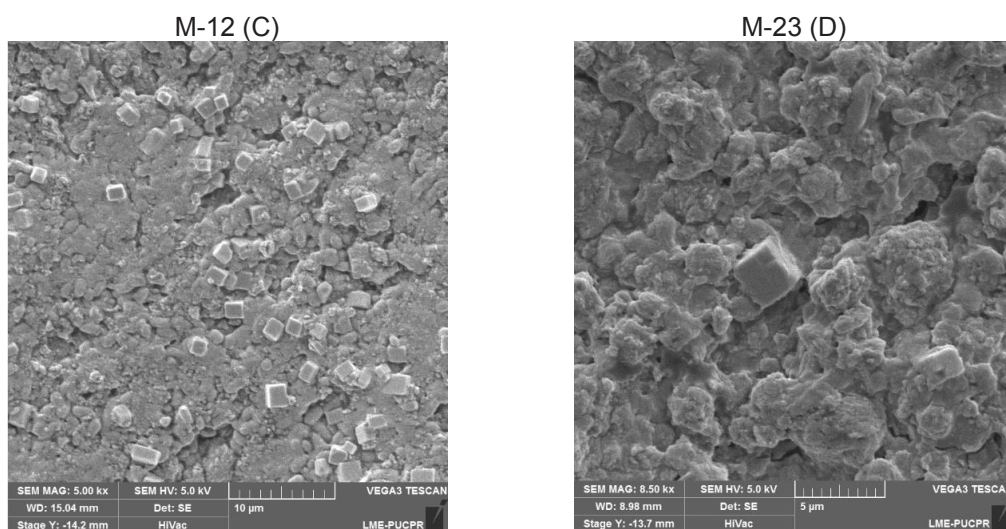
Fonte: O Autor

A halita é o composto químico Cloreto de Sódio (NaCl). No MEV foi possível constatar as formações geométricas espaciais cúbicas desse mineral. Na Figura 50 são apresentadas as imagens dos microrganismos B-422 (A) com 2,5 mil vezes de aumento, B-422 (B) com 8,5 mil vezes de aumento, M-12 (C) com 5 mil vezes de aumento e M-23 (D) apresentando 8,5 mil vezes de aumento.

Figura 50 - MEV dos precipitados dos microrganismos B-422 (A e B), M-12 (C) e M-23 (D) quando exposto ao reagente Cloreto de Cálcio



<sup>12</sup> Banco de Dados cristalográficos da *International Center for Diffraction Data* (ICDD) de 2003.

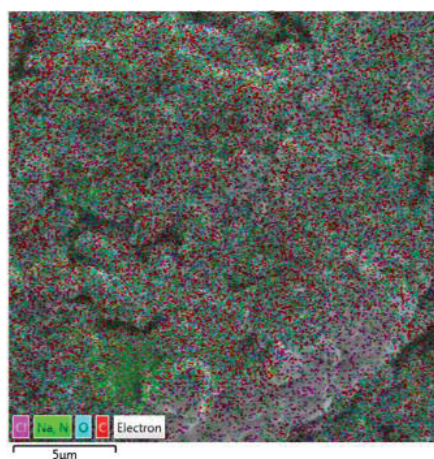


Fonte: O Autor

A atenção é atraída somente para a mineral halita formada, com razão, pois dependendo da concentração formada desse precipitado impossibilitaria a utilização desse reagente para induzir a autocicatrização de materiais que contenham aço, por exemplo em estruturas de concreto armado no geral.

Foi feito para este grupo o EDS para poder verificar se os minerais encontrados no DRX estão coerentes com o que foi visto nas imagens do MEV. Na Figura 51 é apresentada uma imagem de EDS do precipitado do microrganismo marinho M-21. Observe que a porcentagem de cloro é de 19,7% e de sódio 1,3%, o que justifica os indícios de halita que foram encontrados nos difratogramas e nas imagens de MEV.

Figura 51 - Imagem de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) do microrganismo marinho M-21 na presença de Cloreto de Cálcio



| Elemento | Porcentagem (%) |
|----------|-----------------|
| C        | 34,1            |
| O        | 26,3            |
| Cl       | 19,7            |
| Ca       | 18,7            |
| Na       | 1,3             |

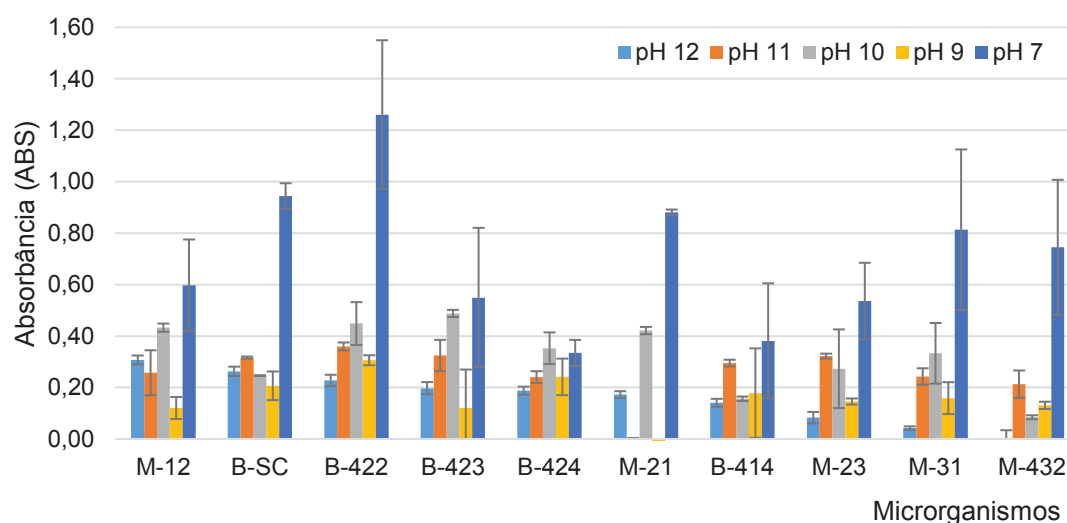
Fonte: O Autor

#### 4.4 RESULTADO DO CRESCIMENTO MICROBIANO EM DIFERENTES PH'S

Os resultados dos crescimentos dos microrganismos que foram submetidos aos diferentes pH's estão apresentados no gráfico da Figura 52. O gráfico foi ordenado em ordem crescente em relação aos crescimentos no pH 12. O experimento no pH 7 foi o mesmo realizado para selecionar os microrganismos no item 4.1, logo, os resultados para o pH 7 são os mesmos apresentados pela Figura 30.

A análise estatística foi realizada através da aplicação da Análise de Variância de Duas Vias (Two Way Anova), o teste utilizado para a comparação múltipla entre médias foi o teste de Tukey. As leituras de Absorbância (ABS) e os dados estatísticos encontram-se no Apêndice VII.

Figura 52 - Crescimento dos microrganismos submetidos a diferentes pH's



Fonte: O Autor

Para o microrganismo *Lysinibacillus sphaericus* B-424 e B-414, os resultados apresentaram-se estatisticamente iguais para todos os pH's, o que se avalia como um resultado positivo, visto que estruturas cimentícias podem atingir pH's alcalinos iguais ou até acima de 12. Esses resultados mostram que essas duas bactérias podem apresentar-se ativas em meios alcalinos ricos em cálcio, o que pode contribuir para a biocalcificação em estruturas de base cimentícia.



O microrganismo B-423 quando em meio de cultura com pH 7 apresentou crescimento estatisticamente igual ao meio com pH 10 e 11, e os crescimentos para os pH's 9 e 12 apresentaram-se estatisticamente iguais. O B-422 foi o que apresentou maior crescimento no pH 7, no qual o mesmo apresentou-se estatisticamente diferente dos demais da série deste microrganismo. Os crescimentos nos pH's 9, 10, 11 e 12 apresentaram-se estatisticamente iguais. Importante elencar que os microrganismos se mostraram ativos e apresentaram crescimentos quando submetidos aos pH's alcalinos.

O microrganismo marinho M-23 quando submetido aos meios de culturas com pH's 7 e 11 apresentaram crescimento estatisticamente iguais. Quando no pH 9, 10 e 12 além de serem diferentes estatisticamente dos anteriores apresentaram crescimentos estatisticamente iguais entre si. Na série do microrganismo M-12 os meios que apresentaram menores crescimentos foram os nos pH's 9, 11 e 12 e foram estatisticamente iguais. O meio de maior crescimento foi o no pH 7, que se apresentou estatisticamente igual somente ao meio com pH 10. O meio com os pH's 10, 11 e 12 apresentaram crescimentos estatisticamente iguais. O crescimento no meio com pH 10 foi estatisticamente diferente somente com o meio de pH 9.

O microrganismo marinho M-432 quando em meio de cultura com pH 7 apresentou crescimento estatístico diferente de todos os pH's. Os meios de culturas com os demais pH's apresentaram crescimento estatisticamente iguais. O M-31 quando em meio de cultura com pH 7 também apresentou crescimento estatístico diferentes dos demais pH's de sua série. O crescimento no meio com o pH 10 apresentou crescimento estatístico diferente somente do meio de cultura com o pH 12, já os pH's 9, 11 e 12 apresentaram crescimento estatístico iguais.

O microrganismo marinho M-21 não apresentou crescimento para as amostras contidas nos meios com pH's 9 e 11. Para os meios com pH's 7, 10 e 12 apresentaram-se estatisticamente diferente os crescimentos.

O *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* (B-SC) quando em meio de cultura com pH 7 apresentaram crescimento estatisticamente diferente dos demais meios da série. Nos demais meios (pH 9, 10, 11 e 12) apresentou crescimento estatisticamente igual.

Para cada série de pH foi necessário realizar uma referência para zerar o equipamento, esse meio de controle é estéril e foi o meio que teve somente a adição do composto químico hidróxido de cálcio com o objetivo de ajuste do pH. A Figura 53 ilustra as diferenças de tonalidades entre os meios com diferentes pH's. Isso acontece devido a quantidade de hidróxido de cálcio que é maior em função do aumento do pH da solução. A importância desta etapa é para garantir que seja calibrado o equipamento para a leitura de cada série de pH diferente.

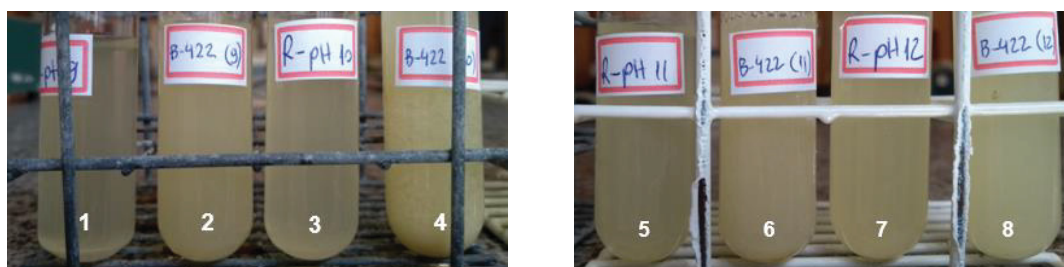
Figura 53 - Amostras de referência para o experimento dos meios de cultura com diferentes pH's



Fonte: O Autor

A Figura 54 mostra os meios de culturas do microrganismo B-422 após 24h de incubação a 30°C. Na imagem, a amostra n° 1 é a amostra de referência para o pH 9, o n° 2 é a amostra contendo o microrganismo, veja que há diferença de turbidez entre ambas, o que mostra que houve uma influência causada pelo microrganismos presente na amostra. O tubo n° 4 (pH 10) foi o que apresentou a maior diferença em relação à sua referência (tubo n° 3), porém apresentou crescimento estatisticamente igual aos dos tubos n° 2 (pH 9), 6 (pH 11) e 8 (pH 12).

Figura 54 - Amostras contendo o microrganismo *Lysinibacillus sphaericus* (B-422) após incubação de 24 horas a 30°C

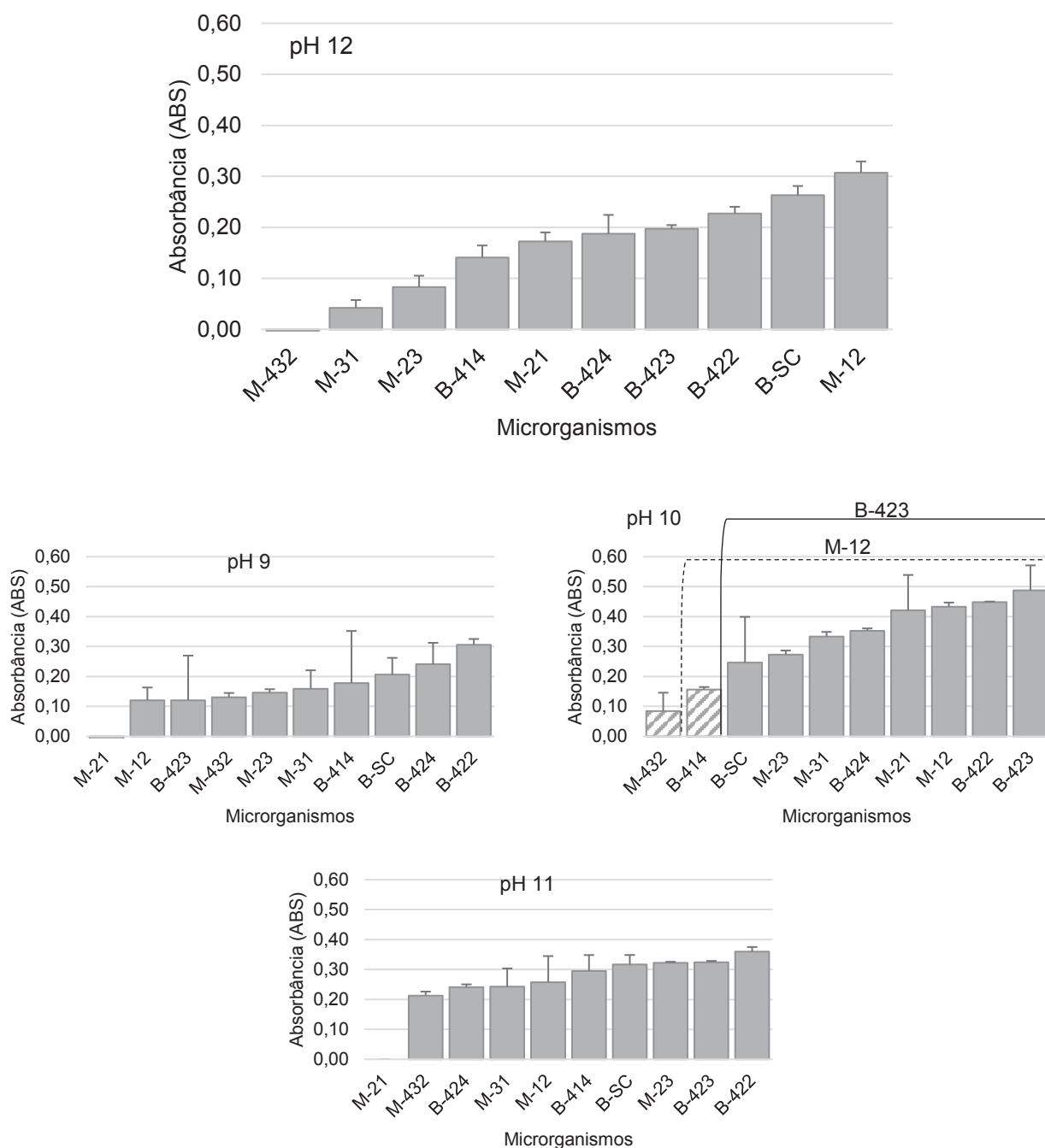


Fonte: O Autor



A Figura 55 apresenta os gráficos com os pH's 9, 10, 11 e 12. Para cada gráfico o pH é fixado para se estimar qual o microrganismo que melhor apresentou crescimento em cada série.

Figura 55 - Gráficos dos crescimentos do microrganismos em função do pH da amostra



Fonte: O Autor

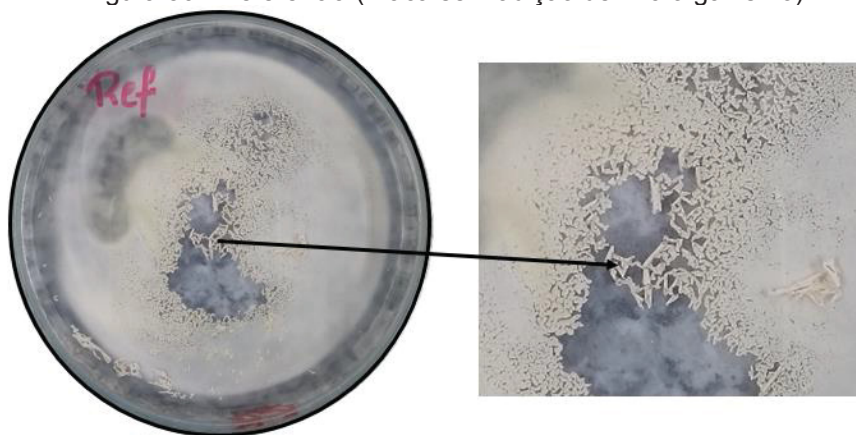
Nos gráficos com o pH 9 e pH 11, o único microrganismo que não apresentou crescimento foi o microrganismo marinho M-21, os nove restantes apresentaram crescimentos estatisticamente iguais nas duas séries.

O gráfico com pH 10 apresenta duas análises, a primeira em relação ao microrganismo B-423 e a segunda em relação ao M-12. Em relação à primeira os únicos microrganismos que se apresentam diferente estatisticamente dos demais são os M-432 e o B-414, os demais apresentam-se iguais. Na segunda análise o único microrganismo que se apresenta com crescimento estatisticamente diferente é o M-432, os demais incluindo o B-414 apresentam-se estatisticamente iguais.

No gráfico com pH 12 o único microrganismo a não apresentar crescimento foi o M-432, os demais apresentaram-se crescimentos estatisticamente iguais.

Para as amostras com o pH 12 pode-se observar, visualmente, que após a indução da precipitação há formação de precipitado nas amostras. Importante notar que, para essas amostras a única fonte de cálcio adicional foi o hidróxido de cálcio como o objetivo de alterar do pH. Conforme ilustra a Figura 56, que é a placa que não há adição de microrganismos, houve um depósito de material após a secagem. Sugere que esse depósito seja de Caldo Nutriente (tonalidade amarelada) e hidróxido de cálcio, haja vista que não houve nenhum microrganismo no meio para induzir qualquer tipo de reação química. Contudo, somente através dos ensaios de caracterização dos materiais, DRX ou MEV que poderá afirmar que material está na placa.

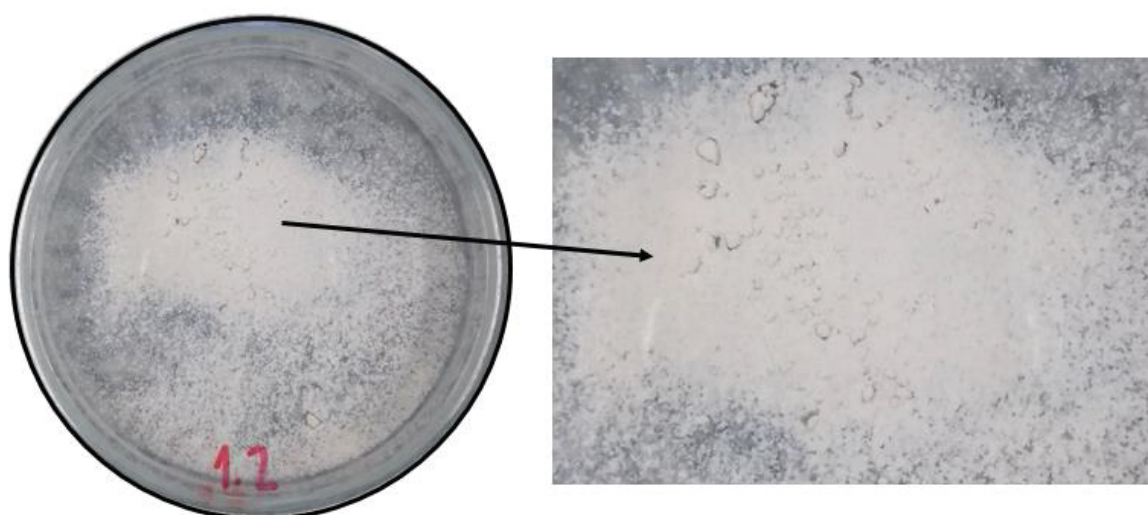
Figura 56 - Referência (Placa sem adição de microrganismo)



Fonte: O Autor

A Figura 57 ilustra a placa com o precipitado do microrganismo M-12, o que apresentou maior crescimento médio quando em meio de cultura com o pH 12. Observa-se que o material precipitado tem coloração branca, o que sugere que o caldo nutriente foi utilizado como fonte de energia e induziu a precipitação do carbonato de cálcio, visto pela sua característica. Conforme o observado na Figura 56, para aumentar pode afirmar que o mineral precipitado é o carbonato de cálcio há a necessidade de efetuar ensaio de caracterização dos materiais, como o DRX e MEV.

Figura 57 - Precipitado do microrganismo M-12, pH 12.

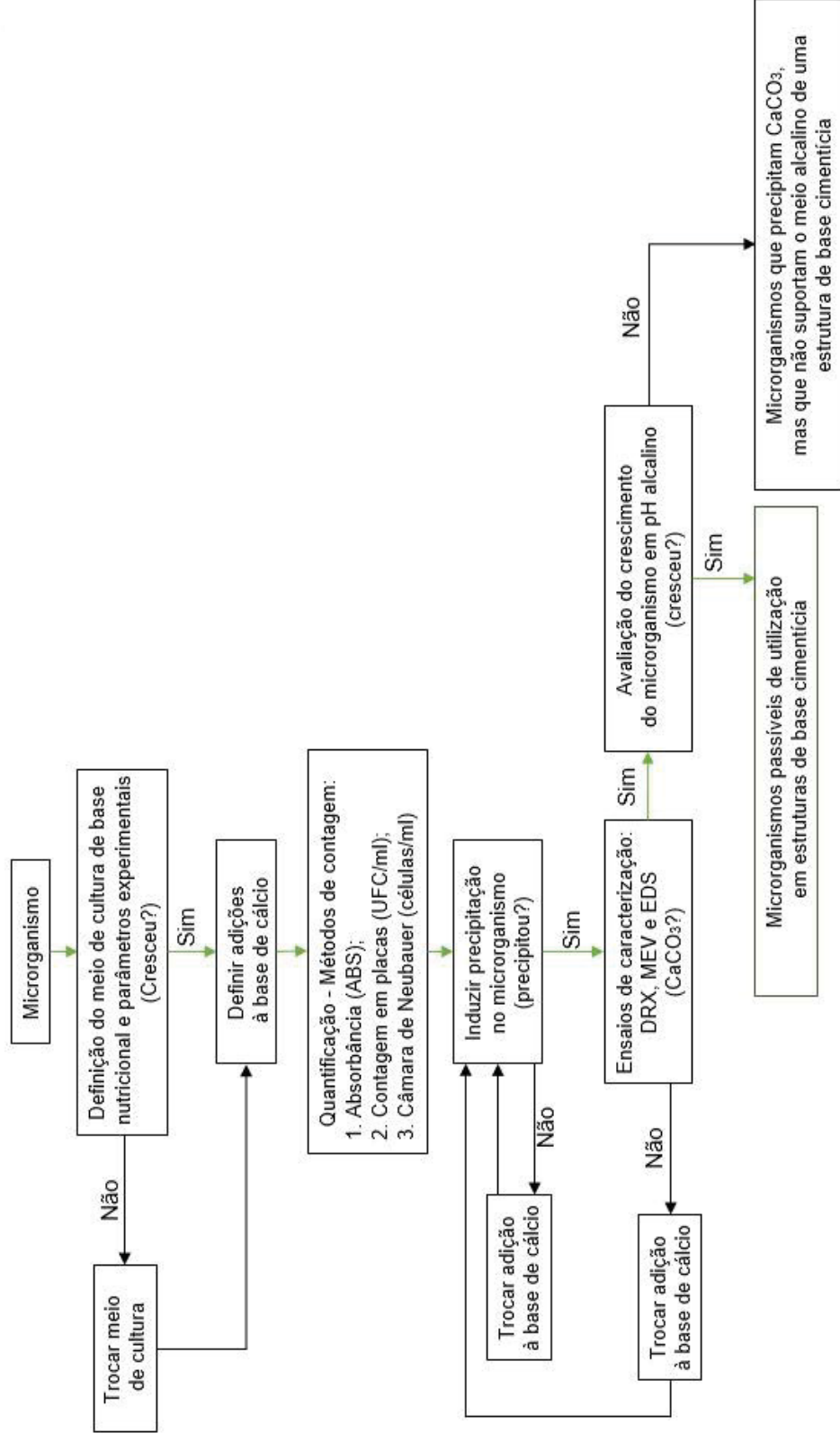


Fonte: O Autor

Para esse experimento não foram realizados os ensaios de caracterização, pois o objetivo era verificar se o microrganismo 1) viveria a tal pH alcalino e 2) se o mesmo precipitaria minerais quando exposto a esse pH.

Para os demais microrganismos esse experimento também foi realizado, e em todos casos houve depósito de materiais que ainda não se têm uma resposta do que são os mesmos. Para trabalhos futuros serão realizados os ensaios de caracterização.

#### 4.5 FLUXOGRAMA DAS ATIVIDADES REALIZADAS NESTE TRABALHO



No Fluxograma apresentado na página anterior representa a ordem que se sucedeu os experimentos. Fica como dica para quem for replicar o trabalho que, pensando-se em estruturas de base cimentícia, o mais importante é avaliar o microrganismo em pH's alcalinos, pois como se sabe os materiais de base cimentícias são alcalinos e para desenvolver o estudo nesse campo o microrganismo tem que sobreviver nele.

Então, uma alteração importante para o fluxograma seria relocar o estudo do pH para após a definição do meio de cultura nutricional do microrganismo, já na fase inicial do estudo.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este capítulo apresenta as conclusões deste presente trabalho, assim como as sugestões para trabalhos futuros nesta linha de pesquisa.

### 5.1 CONCLUSÕES

#### Sobre os métodos de contagem dos microrganismos:

- O método de quantificação pela leitura da Absorbância (ABS) mostrou-se eficaz, assim como foi visto para a classificação das 23 amostras estudadas e nas leituras dos microrganismos submetidos a diferentes pH's.
- Sugere-se que os microrganismos não sejam classificados somente em relação ao crescimento, pois não adianta o microrganismo crescer demasiadamente e não precipitar compostos minerais de carbonato de cálcio.
- O método da diluição seriada e da câmara de Neubauer mostram-se confiáveis, pois as ordens de grandezas mostraram-se próximas, variando de  $10^7$  a  $10^8$  para todos os meios de cultura.

#### Sobre a exposição dos microrganismos a diferentes pH's:

- O estudo dos microrganismos com potencial de cicatrização em meios com pH's alcalinos mostrou-se promissor, visto que houve microrganismos como os *Lysinibacillus sphaericus* INCQS 424 e 414 que apresentaram crescimento estatisticamente iguais para todas as séries (pH 7, 9, 10, 11 e 12), mesmo não apresentando os maiores crescimentos.
- Os microrganismos marinhos mostraram-se promissores em meio alcalino, haja vista que o microrganismo que melhor apresentou crescimento médio no pH 12 foi o M-12, e ainda apresentou crescimento estatisticamente igual aos microrganismos citados na bibliografia como cicatrizantes em estruturas de concreto.

#### Sobre o DRX, MEV e EDS:

- Esses experimentos comprovaram que o precipitado dos microrganismos foram o composto químico carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ). De acordo com os difratogramas das amostras que precipitaram  $\text{CaCO}_3$ , os minerais precipitados foram a calcita e a vaterita.
- Através das imagens de MEV e pela análise do EDS foi possível constatar pelo formato dos cristais e pelos elementos contidos nas amostras que os precipitados são carbonatos de cálcio.

#### Sobre os reagentes ricos em cálcio:

- Os microrganismos que foram expostos ao meio de cultura Caldo Nutriente sem a presença de reagentes ricos em cálcio não apresentaram precipitação de  $\text{CaCO}_3$ . Logo, os microrganismos necessitam de uma adição rica em cálcio para precipitar o  $\text{CaCO}_3$ .
- Todas as adições à base de cálcio (Lactato de cálcio, Acetato de cálcio; Nitrato de cálcio e Cloreto de cálcio) apresentaram microrganismos que precipitaram  $\text{CaCO}_3$ , fato que mostra que todos esses reagentes são aptos a serem utilizados como fonte de cálcio para promover a precipitação dos microrganismos.

#### Sobre os microrganismos:

- O microrganismo B-414 não apresentou precipitação quando a adição do meio foi o acetato de cálcio, porém os outros *L. sphaericus* apresentaram precipitação. Fator que mostra que a linhagem dos microrganismos influencia na precipitação do  $\text{CaCO}_3$ .
- Todos os microrganismos *Lysinibacillus sphaericus*, independente de sua linhagem, apresentaram respostas ao crescimento em pH alcalino, fato que os tornam viáveis e passíveis de serem utilizados como agentes de cicatrização em materiais de base cimentícia.
- Assim como o B-414 os microrganismos B-SC não apresentaram precipitação quando submetidos no meio com adição de acetato de cálcio, mas



nos outros três meios com adição apresentaram precipitação de  $\text{CaCO}_3$ . Mesmo não sabendo as suas linhagens, o B-SC é passível de ser utilizado como agente de cicatrização, pois apresentou precipitado de  $\text{CaCO}_3$  no meio alcalino.

- Os microrganismos marinhos que tiveram dificuldade em sobreviver no meio alcalino foram os microrganismos M-21, que não apresentou crescimento quando em pH 9 e 11, e o microrganismo M-432 que não apresentou crescimento no pH 12. As duas amostras apresentaram precipitados de carbonato de cálcio em todas as adições, porém sugere não continuar os estudos com estes microrganismos já que os mesmos não apresentaram bons desempenhos quando em pH alcalino, fator que impossibilita estes microrganismos de atuarem como agente cicatrizantes em estruturas de base cimentícia.
- O microrganismo marinho M-31 só apresentou precipitação quando no meio com adição de nitrato de cálcio. O M-23 não apresentou precipitação quando em meio com acetato de cálcio.
- O microrganismo marinho que apresentou precipitação em todos os meios a que foi submetido foi o M-12, além disso esse micróbio apresentou bom crescimento quando submetido aos meios alcalinos. O mesmo apresentou desempenho similar aos microrganismos já citados na literatura (*Lysinibacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*). Por esse motivo classifica-se como um microrganismo viável e passível de ser utilizado como agente de cicatrização em materiais de base cimentícia.

## 5.2 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Aprimorar o método de classificação para viabilidade dos microrganismos adicionando séries com pH's alcalinos e diferentes meios de culturas como critério de decisão.
- Correlacionar as leituras de Absorbância (ABS) x Diluição seriada x Câmara de Neubauer e criar uma curva de crescimento para os microrganismos estudados em função do tempo e diferentes pH's.
- Variar os meios de cultura de base nutricional.

- Para os microrganismos marinhos, fazer o sequenciamento genético para descobrir com qual tipo de microrganismo está se trabalhando.
- Desenvolver culturas microbianas esporuladas, para aumentar a resistência das mesmas ao alto pH.
- Investigar a aplicação dos microrganismos em estruturas de base cimentícia.

## REFERÊNCIAS

ACHAL, V.; PAN, X.; ÖZYURT, N. Improved strength and durability of fly ash-amended concrete by microbial calcite precipitation. **Ecological Engineering**, v. 37, n. 4, p. 554-559, 2011.

ACI COMMITTEE 201.2R-01. **Guide to durable concrete ACI Committee 201**, 2008.

AGUIAR, J. B.; CAMÕES, A.; MOREIRA, P. M. Coatings for Concrete Protection against Aggressive Environments. **Journal of Advanced Concrete Technology**. v. 6, n. 1, p. 243-250, 2008.

ANDALIB, R.; MAJID, M. Z. A.; HUSSIN, M. W.; PONRAJ, M.; KEYVANFAR, A.; MIRZA, J.; LEE, H. Optimum concentration of *Bacillus megaterium* for strengthening structural concrete. **Construction and Building Materials**, v. 118, p. 180-193, 2016.

ANVISA. Descrição dos Meios de Cultura Empregados nos Exames Microbiológicos - Módulo IV. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, v. IV, p. 1-66, 2004.

ANVISA. **5 Métodos Gerais** Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2008. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/analise-de-impacto-regulatorio?p\\_p\\_id=110\\_INSTANCE\\_SkX5E3kMwaCk&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&\\_110\\_INSTANCE\\_SkX5E3kMwaCk\\_struts\\_action=%2Fdocument\\_library\\_display%2Fview\\_file\\_entry&\\_110\\_INSTANCE\\_SkX5E3kMwaCk\\_redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fresultado-de-busca%3Fp\\_p\\_id%3D%26p\\_p\\_lifecycle%3D0%26p\\_p\\_state%3Dnormal%26p\\_p\\_mode%3Dview%26p\\_p\\_col\\_id%3Dcolumn-1%26p\\_p\\_col\\_count%3D1%26\\_3\\_groupId%3D0%26\\_3\\_keywords%3Dm%25C3%25A9todos%2Bgerais%26\\_3\\_cur%3D1%26\\_3\\_struts\\_action%3D%252Fsearch%252Fsearch%26\\_3\\_format%3D%26\\_3\\_formDate%3D1441824476958&\\_110\\_INSTANCE\\_SkX5E3kMwaCk\\_fileEntryId=2971974](http://portal.anvisa.gov.br/analise-de-impacto-regulatorio?p_p_id=110_INSTANCE_SkX5E3kMwaCk&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&_110_INSTANCE_SkX5E3kMwaCk_struts_action=%2Fdocument_library_display%2Fview_file_entry&_110_INSTANCE_SkX5E3kMwaCk_redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fresultado-de-busca%3Fp_p_id%3D%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-1%26p_p_col_count%3D1%26_3_groupId%3D0%26_3_keywords%3Dm%25C3%25A9todos%2Bgerais%26_3_cur%3D1%26_3_struts_action%3D%252Fsearch%252Fsearch%26_3_format%3D%26_3_formDate%3D1441824476958&_110_INSTANCE_SkX5E3kMwaCk_fileEntryId=2971974)>

AZEVEDO, S. M. F. O. Toxinas de cianobactérias : causas e consequências para a saúde pública. **Med On Line**, v. 1, p. 1-16, 1998.

BANG, S. S.; GALINAT, J. K.; RAMAKRISHNAN, V. Calcite precipitation induced by polyurethane-immobilized *Bacillus pasteurii*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 4-5, p. 404-409, 2001.

BLAISZIK, B. J.; KRAMER, S. L. B.; OLUGEBEFOLA, S. C.; MOORE, J. S.; SOTTOS, N. R.; WHITE, S. R. Self-Healing Polymers and Composites. **The Annual Review of Materials Research**, v. 40, p. 179-211, 2010.

BOQUET, E.; BORONAT, A.; RAMOS-CORMENZANA, A. Production of Calcite (Calcium Carbonate) Crystals by Soil Bacteria is a General Phenomenon. **Nature**, v. 246, n. c, p. 527-529, 1973.

BRAND. **Câmaras de contagem**, 2013. Disponível em: <www.brand.de>

CAILLEUX, E.; POLLET, V. Investigations on the development of self-healing properties in protective coatings for concrete and repair mortars. **2nd International Conference on Self Healing Materials**, v. 32, n. 0, p. 1-4, 2009.

CHAHAL, N.; SIDDIQUE, R.; RAJOR, A. Influence of bacteria on the compressive strength, water absorption and rapid chloride permeability of fly ash concrete. **Construction and Building Materials**, v. 28, n. 1, p. 351-356, 2012.

CRAVEN, J. M. Cross-linked thermally reversible polymers produced from condensation polymers with pendant furan groups cross-linked with maleimides. **United States Patent Office**. n. 5, p. 5, 1966.

DA SILVA, F. B.; DE BELIE, N.; BOON, N.; VERSTRAETE, W. Production of non-axenic ureolytic spores for self-healing concrete applications. **Construction and Building Materials**, v. 93, p. 1034-1041, 2015.

DA SILVA, F. B.; BOON, N.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Industrial application of biological self-healing concrete: Challenges and economical feasibility. **Journal of Commercial Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 31-38, 2015.

DE MUYNCK, W.; COX, K.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Bacterial carbonate precipitation as an alternative surface treatment for concrete. **Construction and Building Materials**, v. 22, n. 5, p. 875-885, 2008a.

DE MUYNCK, W.; DEBROUWER, D.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Bacterial carbonate precipitation improves the durability of cementitious materials. **Cement and Concrete Research**, v. 38, n. 7, p. 1005-1014, 2008b.

DE MUYNCK, W.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Microbial carbonate precipitation in construction materials: A review. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 2, p. 118-136, 2010.

DRY, C. Matrix cracking, repair and filling using active and passive modes for smart times releases of internal chemicals. **Smart Mater Struct**, v. 3, p. 118-123, 1994.

DRY, C. Procedures developed for self-repair of polymer matrix composite materials. **Composite Structures**, v. 35, n. 3, p. 263-269, 1996.

DRY, C. Repair and prevention of damage due to transverse shrinkage cracks in bridge decks. **1999 Symposium on Smart Structures and Materials**, v. 3671, n. March 1999, p. 253-256, 1999.

ERCOLE, C.; CACCHIO, P.; BOTTA, A. L.; CENTI, V.; LEPIDI, A. Bacterially Induced Mineralization of Calcium Carbonate : The Role of Exopolysaccharides

and Capsular Polysaccharides. **Microscopy and Microanalysis**, v. 13, p. 42-50, 2007.

FAPESP. **Especialistas discutem papel da indústria do cimento nas emissões de CO<sub>2</sub>**. Disponível em: <<http://agencia.fapesp.br/especialistas-discutem-papel-da-industria-do-cimento-nas-emissoes-de-co2/23449/>>.

GHOSH, S. K. (ED.). **Self-Healing Materials: Fundamentals, Design Strategies, and Applications**. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA Weinheim, p. 307, 2009.

GOLLAPUDI, U.; KNUTSON, C.; BANG, S.; ISLAM, M. A new method for controlling leaching through permeable channels. **Chemosphere**, v. 30, n. 4, p. 695-705, 1995.

HOLA, J.; KSIAZEK, M. Research on usability of sulphur polymer composite for corrosion protection of reinforcing steel in concrete. v. IX, n. 1, p. 13-16, 2009.

**InfoEscola - Espectrofotômetro**. Disponível em: <<https://www.infoescola.com/materiais-de-laboratorio/espectrofotometro/>>. Acesso em: 7 abr. 2019.

JAGANNATHAN, P.; SATYA, K. S.; ARUNACHALAM, K. D.; ANNAMALAI, S. K. Studies on the mechanical properties of bacterial concrete with two bacterial species. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 2, p. 8875-8879, 2018.

JONKERS, H. M.; THIJSEN, A.; MUYZER, G.; COPUROGLU, O.; SCHLANGEN, E. Application of bacteria as self-healing agent for the development of sustainable concrete. **Ecological Engineering**, v. 36, n. 2, p. 230-235, 2010.

JONKERS, H. M. Bacteria-Based self-healing concrete. **Heron** v. 56, p. 12, 2011.

JONKERS, H. M.; SCHLANGEN, E. Self-healing of cracked concrete: a bacterial approach. **6th International Conference on Fracture Mechanics of Concrete and Concrete Structures**, v. 3, p. 1821-1826, 2007.

JONKERS, H. M.; SCHLANGEN, E. A two component bacteria-based self-healing concrete. **Concrete repair, Rehabilitation and Retrofitting II**, p. 119-120, 2009.

JONKERS, H. M.; THIJSEN, A. Bacteria Mediated of Concrete Structures. **2nd International Symposium on Service Life Design for Infrastructure 4-6 October 2010, Delft, The Netherlands**, n. October, p. 833-840, 2010.

KALFON, A.; BARJAC, H. DE. Growth, sporulation and larvicidal activity of *Bacillus sphaericus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 1983, n. 18, p. 168-173, 1983.

KHALIQ, W.; EHSAN, M. B. Crack healing in concrete using various bio influenced self-healing techniques. **Construction and Building Materials**. v. 102, p. 349-357, 2016.

LUO, M.; QIAN, C. X. Performance of Two Bacteria-Based Additives Used for Self-Healing Concrete. **Journal of Materials in Civil Engineering**, v. 28, n. 12, p. 5-8, 2016.

LUO, M.; QIAN, C. X.; LI, R. Y. Factors affecting crack repairing capacity of bacteria-based self-healing concrete. **Construction and Building Materials**, v. 87, p. 1-7, 2015.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 10<sup>a</sup> Ed. São Paulo - SP: Pearson Education do Brasil, 2004.

MAHESWARAN, S.; DASURU, S. S.; RAMA, A.; MURTHY, C.; BHUVANESHWARI, B.; KUMAR, V. R.; PALANI, G. S.; IYER, N. R.; KRISHNAMOORTHY, S.; SANDHYA, S. Strength improvement studies using new type wild strain *Bacillus cereus* on cement mortar. **Current Science**. v. 106 n. 1, 2016.

MALINSKII, Y. M.; DASURU, S. S.; RAMA, A.; MURTHY, C.; BHUVANESHWARI, B.; KUMAR, V. R.; PALANI, G. S.; IYER, N. R.; KRISHNAMOORTHY, S.; SANDHYA, S. Investigation of self-healing of cracks in polymers. **Polymer Mechanics**, v. 6, n. 2, p. 240-244, 1969.

MARANGONI, L. F. B.; MARQUES, J. A.; BIANCHINI, A. **Conhecendo os Recifes Brasileiros**. Rio de Janeiro - RJ: Projeto Coral Vivo, 2016.

MEDEIROS, M. H. F.; HELENE, P. Estudo da carbonatação em concretos e argamassas. **Revista Engenharia, Ciência e Tecnologia**, v. 4, n. 4, p. 3-12, 2001.

NASSRALLAH-ABOUKAÏS, N.; JACQUEMIN, J.; DECARNE, C.; ABI-AAD, E.; LAMONIER, J. F.; ABOUKAÏS, A. Transformation of vaterite into calcite in the absence and the presence of copper ( II ) species . Thermal analysis , IR and EPR study. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 74, p. 21-27, 2003.

NEWMAN, J.; CHOO, B. S. **Advance concrete technology: constituent material**. Elsevier, 2003.

NOSOUHIAN, F.; MOSTOFINEJAD, D.; HASHEMINEJAD, H. Influence of biodeposition treatment on concrete durability in a sulphate environment. **Biosystems Engineering**, v. 133, p. 141-152, 2015.

OLIVEIRA, I. A.; MARCONDES, C. G. N.; MIRANDA, D. C.; SOARES, G. R.; MEDEIROS, M. H. F. Concreto autocicatrizante - Uma revisão. **3º Encontro**

**Luso-Brasileiro de Degradação em Estruturas de Concreto Armado**, São Carlos-SP, 2018.

RAMAKRISHNAN, V.; PANCHALAN, R. K.; BANG, S. S. Improvement of Concrete Durability By Bacterial Mineral Precipitation. **International Conference on Fracture**, p. 1-6, 2005.

SÁNCHEZ-ROMÁN, M.; RIVADENEYRA, M. A.; VASCONCELOS, C. M.; JUDITH. A. Biomineralization of carbonate and phosphate by moderately halophilic bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 61, p. 273-284, 2007.

SANGADJI, S. Can Self-healing Mechanism Helps Concrete Structures Sustainable? **Procedia Engineering**, v. 171, p. 238-249, 2017.

SEIFAN, M.; SAMANI, A. K.; BERENJIAN, A. Bioconcrete: next generation of self-healing concrete. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2591-2602, 2016.

SHIRAKAWA, M. A.; CINCOTTO, M. A.; ATENCIO, D.; GAYLARDE, C. C.; JOHN, V. M. Effect of culture medium on biocalcification by *Pseudomonas putidas*, *Lysinibacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 499-507, 2011.

SIDDIQUE, R.; NANDA, V.; KUNAL; KADRI, E. H.; IQBAL KHAN, M.; SINGH, M.; RAJOR, A. Influence of bacteria on compressive strength and permeation properties of concrete made with cement baghouse filter dust. **Construction and Building Materials**, v. 106, p. 461-469, 2016.

SIDDIQUE, R.; CHAHAL, N. K. Effect of ureolytic bacteria on concrete properties. **Construction and Building Materials**, v. 25, n. 10, p. 3791-3801, 2011.

SIERRA-BELTRAN, M. G.; JONKERS, H. M.; SCHLANGEN, E. Characterization of sustainable bio-based mortar for concrete repair. **Construction and Building Materials**, v. 67, n. PART C, p. 344-352, 2014.

STOCKS-FISCHER, S.; GALINAT, J. K.; BANG, S. S. Microbiological precipitation of  $\text{CaCO}_3$ . **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n. 11, p. 1563-1571, 1999.

TAKAGI, E. M.; LIMA, M. G.; HELENE, P. Concretos autocicatrizantes com cimentos brasileiros de escória de alto forno ativados por catalisador cristalino. **Concreto**, p. 1-4, 2016.

TALAEKHOZAN, A.; KEYVANFAR, A.; SHAFAGHAT, A.; ANDALIB, R.; MAJID, M. Z. A.; FULAZZAKY, M. A. A review of self-healing concrete research development. **Journal of Environmental Treatment Techniques**, v. 2, n. 1, p. 1-11, 2014.



TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre - RS: ARTMED EDITORA S.A., 2005.

TZIVILOGLOU, E.; WIKTOR, V.; JONKERS, H. M.; SCHLANGEN, E. Bacteria-based self-healing concrete to increase liquid tightness of cracks. **Construction and Building Materials**, v. 122, p. 118-125, 2016.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. **Public Health Service**, v. 5th Editio, n. April, p. 1-250, 1999.

VAN TITTELBOOM, K.; DE BELIE, N.; DE MUYNCK, W.; VERSTRAETE, W. Use of bacteria to repair cracks in concrete. **Cement and Concrete Research**, v. 40, n. 1, p. 157-166, 2010.

VAN TITTELBOOM, K.; DE BELIE, N.; VAN LOO, D.; JACOBS, P. Self-healing efficiency of cementitious materials containing tubular capsules filled with healing agent. **Cement and Concrete Composites**, v. 33, n. 4, p. 497-505, 2011.

VAN TITTELBOOM, K.; DE BELIE, N. Self-healing in cementitious materials-a review. **Materials**, v. 6, 2013.

WANG, J. Y.; VAN TITTELBOOM, K.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. **Construction and Building Materials**, v. 26, n. 1, p. 532-540, 2012.

WANG, J. Y.; VAN TITTELBOOM, K.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Potential of Applying Bacteria to Heal Cracks in Concrete. **Secound International Conference on Sustainable Construction Materials and Technologies**, p. 1-12, 2010.

WANG, J. Y.; SOENS, H.; VERSTRAETE, W.; DE BELIE, N. Self-healing concrete by use of microencapsulated bacterial spores. **Cement and Concrete Research**, v. 56, p. 139-152, 2014.

WANG, J. Y.; DE BELIE, N.; VERSTRAETE, W. Diatomaceous earth as a protective vehicle for bacteria applied for self-healing concrete. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 4, p. 567-577, 2012.

WHITE, S. R.; SOTTOS, N. R.; GEUBELLE, P. H.; MOORE, J. S.; KESSLER, M. R.; SRIRAM, S. R.; BROWN, E. N. VISWANATHAN, S. Autonomic healing of polymer composites. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 794-797, 2001.

WIKIPÉDIA - **Espectro Visível**. Disponível em:  
<[https://pt.wikipedia.org/wiki/Espectro\\_visível](https://pt.wikipedia.org/wiki/Espectro_visível)>. Acesso em: 7 abr. 2019.

WIKTOR, V.; JONKERS, H. M. Quantification of crack-healing in novel bacteria-based self-healing concrete. **Cement and Concrete Composites**, v. 33, n. 7,

p. 763-770, 2011.

WOOL, R. P. Crack healing in semicrystalline polymers, block copolymers and filled elastomers. **Adhesion and Adsorption of Polymers**, n. 1, p. 341-362, 1980.

WOOL, R. P.; O'CONNOR, K. M. A theory of crack healing in polymers. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 10, p. 5953-5963, 1981.

WU, M.; JOHANNESSEN, B.; GEIKER, M. A review: self-healing in cementitious materials and engineered cementitious composite as a self-healing material. **Construction and Building Materials**, v. 28, n. 1, p. 571-583, 2012.

YANG, Z.; HOLLAR, J.; HE, X.; SHI, X. Laboratory Assessment of a Self-Healing Cementitious Composite. **Journal of the Transportation Research Board**, v. 2142, n. November 2016, p. 9-17, 2010.

ZHANG, J.; LIU, Y.; FENG, T.; ZHOU, M.; ZHAO, L.; ZHOU, A.; LI, Z. Immobilizing bacteria in expanded perlite for the crack self-healing in concrete. **Construction and Building Materials**, v. 148, p. 610-617, 2017.

ZWAAG, S. VAN DER (ED.). **Self Healing Materials: An Alternative Approach to 20 Centuries of Materials Science**. Springer, p. 398, 2007.

## APÊNDICE I - DADOS PARA ESCOLHA DOS 10 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS

Tabela 13 - Dados - Espectrofotômetro (ABS).

| B-414 | B-422 | B-423 | B-424 | B-Meg <sup>13</sup> | B-SC  | M-11  | M-12  | M-13    | M-21  | M-22    |
|-------|-------|-------|-------|---------------------|-------|-------|-------|---------|-------|---------|
| 0,155 | 1,079 | 0,842 | 0,315 | -0,685              | 0,897 | 0,220 | 0,673 | -0,0649 | 0,87  | -0,083  |
| 0,602 | 1,108 | 0,499 | 0,392 | -0,637              | 0,996 | 0,299 | 0,725 | -0,0731 | 0,892 | -0,0900 |
| 0,387 | 1,594 | 0,306 | 0,297 | -0,685              | 0,939 | 0,239 | 0,394 | -0,0701 | 0,88  | -0,089  |

| M-23  | M-31  | M-32   | M-33  | M-41   | M-42 <sup>14</sup> | M-43   | M-51   | M-52   | M-53  | M-62  | M-432 |
|-------|-------|--------|-------|--------|--------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|
| 0,394 | 0,455 | -0,209 | 0,338 | -0,737 | 0,0265             | 0,133  | -0,664 | -0,699 | 0,371 | 0,302 | 0,878 |
| 0,522 | 0,955 | -0,078 | 0,393 | -0,676 | 0,0112             | -0,133 | -0,586 | -0,674 | 0,380 | 0,34  | 0,443 |
| 0,691 | 1,029 | -0,111 | 0,365 | -0,630 | 0,0098             | 0,127  | -0,515 | -0,665 | 0,33  | 0,398 | 0,914 |

Tabela 14 - Teste de Normalidade - Shapiro-Wilk

| Testes de Normalidade - Shapiro-Wilk |             |    |       |
|--------------------------------------|-------------|----|-------|
| Microrganismo                        | Estatística | gl | p     |
| B-414                                | 1,000       | 3  | 0,958 |
| B-422                                | 0,792       | 3  | 0,096 |
| B-423                                | 0,975       | 3  | 0,694 |
| B-424                                | 0,886       | 3  | 0,342 |
| M-11                                 | 0,918       | 3  | 0,444 |
| M-12                                 | 0,864       | 3  | 0,280 |
| M-13                                 | 0,977       | 3  | 0,706 |
| M-21                                 | 0,997       | 3  | 0,900 |
| M-22                                 | 0,855       | 3  | 0,253 |
| M-23                                 | 0,994       | 3  | 0,848 |
| M-31                                 | 1,000       | 3  | 0,980 |
| M-32                                 | 0,924       | 3  | 0,467 |
| M-33                                 | 0,845       | 3  | 0,227 |
| M-41                                 | 0,993       | 3  | 0,846 |
| M-42                                 | 0,812       | 3  | 0,144 |
| M-43                                 | 0,767       | 3  | 0,038 |
| M-51                                 | 0,999       | 3  | 0,948 |
| M-52                                 | 0,931       | 3  | 0,493 |

<sup>13</sup> Microrganismo *Bacillus megaterium* (B-Meg) não passou no teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

<sup>14</sup> Microrganismo marinho M-42, não passou no teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

|              |              |   |              |
|--------------|--------------|---|--------------|
| M-53         | 0,880        | 3 | 0,324        |
| M-62         | 0,986        | 3 | 0,771        |
| M-432        | 0,807        | 3 | 0,131        |
| <i>B-Meg</i> | <i>0,750</i> | 3 | <i>0,000</i> |
| B-SC         | 0,992        | 3 | 0,833        |

Tabela 15 - Análise de Variância de Uma Via (One Way Anova)

| Fonte de Variação | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Média quadrática | Teste F       | Valor p |
|-------------------|--------------------|--------------------|------------------|---------------|---------|
| Entre grupos      | 20                 | 16,876             | 0,844            | <b>39,235</b> | <0,001  |
| Resíduo           | 42                 | 0,903              | 0,0215           |               |         |
| <b>Total</b>      | <b>62</b>          | <b>17,779</b>      |                  |               |         |

## APÊNDICE II - PLACAS DE PETRI - DILUIÇÃO SERIADA

Abaixo, são apresentadas as placas com os meios de cultura à base Lactato de Cálcio (Figura 58), Cloreto de Cálcio (Figura 59), Nitrato de Cálcio (Figura 60) e Acetato de Cálcio (Figura 61).

Figura 58 - Diluição Seriada: Ágar Nutriente com adição de Lactato de Cálcio (5g/l)

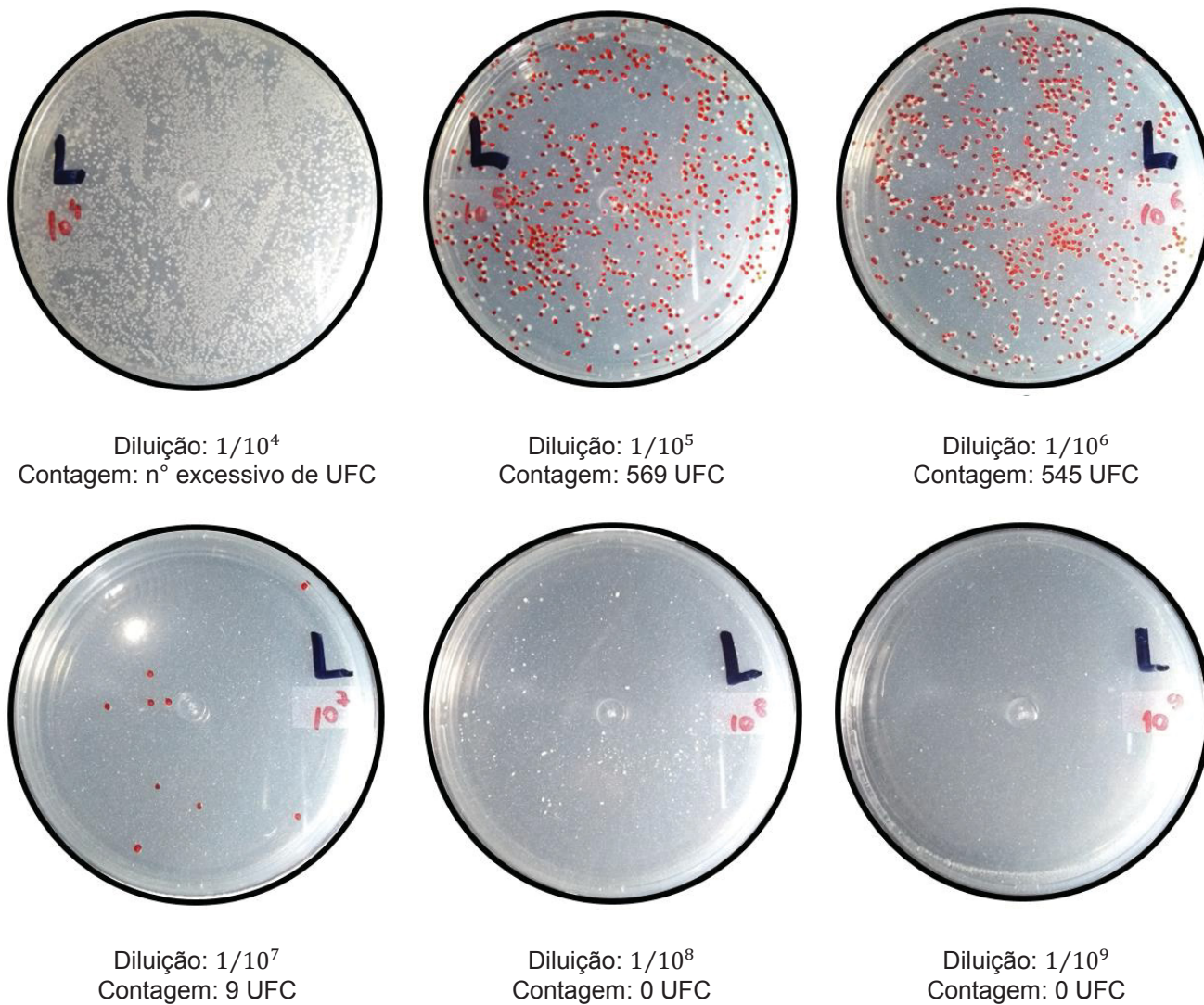
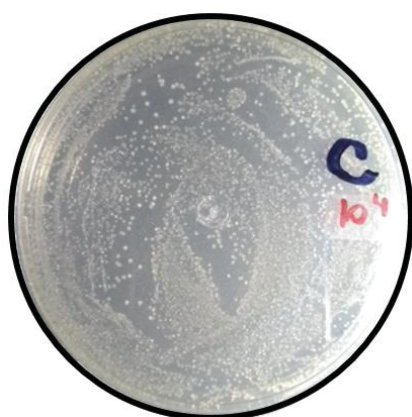
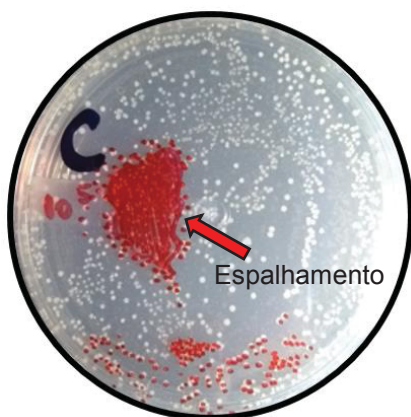


Figura 59 - Diluição Seriada: Ágar Nutriente com adição de Cloreto de Cálcio (5g/l)



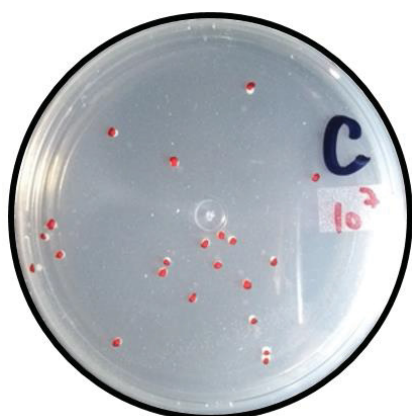
Diluição:  $1/10^4$   
Contagem: n° excessivo de UFC



Diluição:  $1/10^5$   
Contagem: n° excessivo de UFC



Diluição:  $1/10^6$   
Contagem: 203 UFC



Diluição:  $1/10^7$   
Contagem: 22 UFC



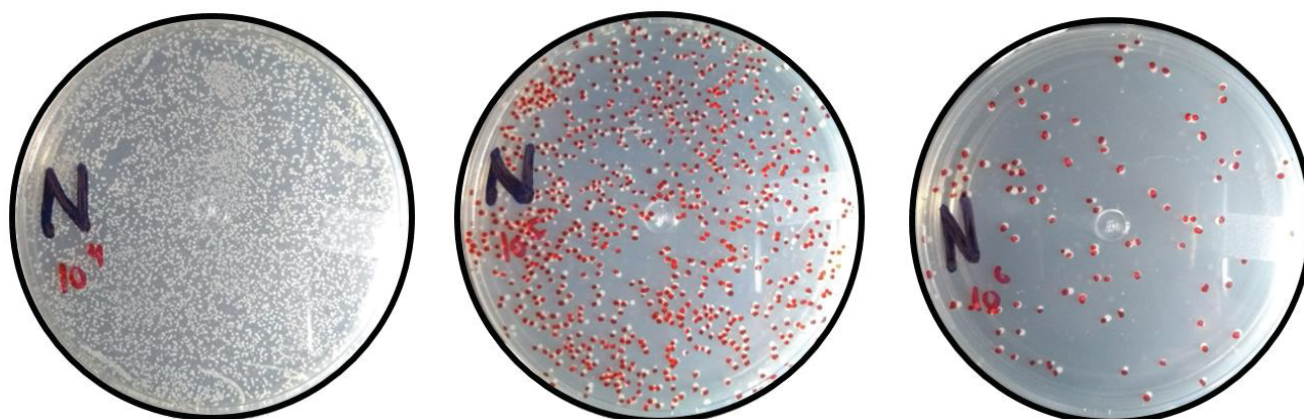
Diluição:  $1/10^8$   
Contagem: 0 UFC



Diluição:  $1/10^9$   
Contagem: 0 UFC



Figura 60 - Diluição Seriada: Ágar Nutriente com adição de Nitrato de Cálcio (5g/l)



Diluição:  $1/10^4$   
Contagem: n° excessivo de UFC

Diluição:  $1/10^5$   
Contagem: 766 UFC

Diluição:  $1/10^6$   
Contagem: 96 UFC

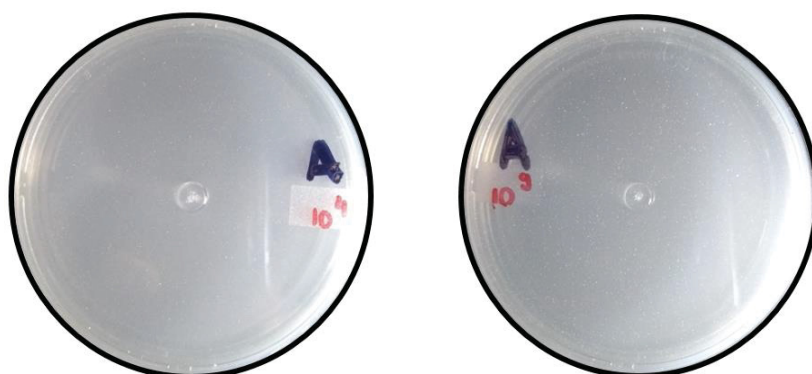


Diluição:  $1/10^7$   
Contagem: 12 UFC

Diluição:  $1/10^8$   
Contagem: 0 UFC

Diluição:  $1/10^9$   
Contagem: 0 UFC

Figura 61 - Diluição Seriada: Ágar Nutriente com adição de Acetato de Cálcio (5g/l)



Diluição:  $1/10^4$   
Contagem: 0 UFC



Diluição:  $1/10^9$   
Contagem: 0 UFC



### APÊNDICE III - COMPARAÇÃO ENTRE MICRORGANISMOS E REAGENTES (ANOVA DE DUAS VIAS E TESTE DE TUKEY)

Tabela 16 - Anova de duas vias (Two Way Anova) entre microrganismo e reagentes

| Fonte de Variação               | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Média quadrática | Teste F        | Valor p |
|---------------------------------|--------------------|--------------------|------------------|----------------|---------|
| <b>Microrganismo</b>            | 9                  | 36,378             | 4,042            | <b>115,439</b> | <0,001  |
| <b>Reagente</b>                 | 4                  | 6,356              | 1,589            | <b>45,384</b>  | <0,001  |
| <b>Microrganismo x Reagente</b> | 36                 | 24,804             | 0,689            | <b>19,678</b>  | <0,001  |
| <b>Resíduo</b>                  | 100                | 3,501              | 0,035            |                |         |
| <b>Total</b>                    | 149                | 71,04              | 0,477            |                |         |

Tabela 17 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - Microrganismos com Caldo Nutriente

| Comparação      | Diferença entre médias | p  | q      | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|----|--------|--------|--------------------------|
| B-423 vs. M-31  | 2,044                  | 10 | 18,917 | <0,001 | Yes <sup>1</sup>         |
| B-423 vs. B-SC  | 1,028                  | 10 | 9,516  | <0,001 | Yes                      |
| B-423 vs. B-414 | 0,321                  | 10 | 2,974  | 0,53   | No <sup>2</sup>          |
| B-423 vs. M-432 | 0,281                  | 10 | 2,601  | 0,709  | Do Not Test <sup>2</sup> |
| B-423 vs. B-422 | 0,274                  | 10 | 2,539  | 0,736  | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-21  | 0,273                  | 10 | 2,53   | 0,74   | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-12  | 0,083                  | 10 | 0,768  | 1      | Do Not Test              |
| B-423 vs. B-424 | 0,0403                 | 10 | 0,373  | 1      | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-23  | 0,015                  | 10 | 0,139  | 1      | Do Not Test              |
| M-23 vs. M-31   | 2,029                  | 10 | 18,778 | <0,001 | Yes                      |
| M-23 vs. B-SC   | 1,013                  | 10 | 9,377  | <0,001 | Yes                      |
| M-23 vs. B-414  | 0,306                  | 10 | 2,836  | 0,598  | Do Not Test              |
| M-23 vs. M-432  | 0,266                  | 10 | 2,462  | 0,769  | Do Not Test              |
| M-23 vs. B-422  | 0,259                  | 10 | 2,4    | 0,794  | Do Not Test              |
| M-23 vs. M-21   | 0,258                  | 10 | 2,391  | 0,798  | Do Not Test              |
| M-23 vs. M-12   | 0,068                  | 10 | 0,629  | 1      | Do Not Test              |
| M-23 vs. B-424  | 0,0253                 | 10 | 0,234  | 1      | Do Not Test              |
| B-424 vs. M-31  | 2,003                  | 10 | 18,544 | <0,001 | Yes                      |
| B-424 vs. B-SC  | 0,988                  | 10 | 9,142  | <0,001 | Yes                      |
| B-424 vs. B-414 | 0,281                  | 10 | 2,601  | 0,709  | Do Not Test              |
| B-424 vs. M-432 | 0,241                  | 10 | 2,228  | 0,857  | Do Not Test              |
| B-424 vs. B-422 | 0,234                  | 10 | 2,166  | 0,876  | Do Not Test              |
| B-424 vs. M-21  | 0,233                  | 10 | 2,157  | 0,879  | Do Not Test              |
| B-424 vs. M-12  | 0,0427                 | 10 | 0,395  | 1      | Do Not Test              |
| M-12 vs. M-31   | 1,961                  | 10 | 18,149 | <0,001 | Yes                      |
| M-12 vs. B-SC   | 0,945                  | 10 | 8,747  | <0,001 | Yes                      |
| M-12 vs. B-414  | 0,238                  | 10 | 2,206  | 0,864  | Do Not Test              |

|                 |         |    |         |        |             |
|-----------------|---------|----|---------|--------|-------------|
| M-12 vs. M-432  | 0,198   | 10 | 1,833   | 0,952  | Do Not Test |
| M-12 vs. B-422  | 0,191   | 10 | 1,771   | 0,962  | Do Not Test |
| M-12 vs. M-21   | 0,19    | 10 | 1,762   | 0,963  | Do Not Test |
| M-21 vs. M-31   | 1,77    | 10 | 16,387  | <0,001 | Yes         |
| M-21 vs. B-SC   | 0,755   | 10 | 6,985   | <0,001 | Yes         |
| M-21 vs. B-414  | 0,048   | 10 | 0,444   | 1      | Do Not Test |
| M-21 vs. M-432  | 0,00767 | 10 | 0,071   | 1      | Do Not Test |
| M-21 vs. B-422  | 0,001   | 10 | 0,00926 | 1      | Do Not Test |
| B-422 vs. M-31  | 1,769   | 10 | 16,378  | <0,001 | Yes         |
| B-422 vs. B-SC  | 0,754   | 10 | 6,976   | <0,001 | Yes         |
| B-422 vs. B-414 | 0,047   | 10 | 0,435   | 1      | Do Not Test |
| B-422 vs. M-432 | 0,00667 | 10 | 0,0617  | 1      | Do Not Test |
| M-432 vs. M-31  | 1,763   | 10 | 16,316  | <0,001 | Yes         |
| M-432 vs. B-SC  | 0,747   | 10 | 6,915   | <0,001 | Yes         |
| M-432 vs. B-414 | 0,0403  | 10 | 0,373   | 1      | Do Not Test |
| B-414 vs. M-31  | 1,722   | 10 | 15,943  | <0,001 | Yes         |
| B-414 vs. B-SC  | 0,707   | 10 | 6,541   | <0,001 | Yes         |
| B-SC vs. M-31   | 1,016   | 10 | 9,401   | <0,001 | Yes         |

<sup>1</sup>Yes: significa que há diferença estatística

<sup>2</sup>No ou Do not test: significa que não há diferença estatística

Tabela 18 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - Microrganismos com Caldo Nutriente + Lactato de Cálcio

| Comparação      | Diferença entre médias | p  | q      | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|----|--------|--------|--------------------------|
| M-12 vs. B-SC   | 1,827                  | 10 | 16,914 | <0,001 | Yes                      |
| M-12 vs. M-31   | 0,8                    | 10 | 7,402  | <0,001 | Yes                      |
| M-12 vs. M-23   | 0,739                  | 10 | 6,84   | <0,001 | Yes                      |
| M-12 vs. B-414  | 0,598                  | 10 | 5,532  | 0,006  | Yes                      |
| M-12 vs. M-432  | 0,416                  | 10 | 3,854  | 0,178  | No                       |
| M-12 vs. B-423  | 0,315                  | 10 | 2,919  | 0,557  | Do Not Test              |
| M-12 vs. B-422  | 0,2                    | 10 | 1,854  | 0,949  | Do Not Test              |
| M-12 vs. M-21   | 0,174                  | 10 | 1,611  | 0,979  | Do Not Test              |
| M-12 vs. B-424  | 0,0857                 | 10 | 0,793  | 1      | Do Not Test              |
| B-424 vs. B-SC  | 1,742                  | 10 | 16,122 | <0,001 | Yes                      |
| B-424 vs. M-31  | 0,714                  | 10 | 6,609  | <0,001 | Yes                      |
| B-424 vs. M-23  | 0,653                  | 10 | 6,047  | 0,002  | Yes                      |
| B-424 vs. B-414 | 0,512                  | 10 | 4,739  | 0,036  | Yes                      |
| B-424 vs. M-432 | 0,331                  | 10 | 3,061  | 0,488  | Do Not Test              |
| B-424 vs. B-423 | 0,23                   | 10 | 2,126  | 0,888  | Do Not Test              |
| B-424 vs. B-422 | 0,115                  | 10 | 1,061  | 0,999  | Do Not Test              |

|                 |        |    |        |        |             |
|-----------------|--------|----|--------|--------|-------------|
| B-424 vs. M-21  | 0,0883 | 10 | 0,818  | 1      | Do Not Test |
| M-21 vs. B-SC   | 1,653  | 10 | 15,304 | <0,001 | Yes         |
| M-21 vs. M-31   | 0,626  | 10 | 5,791  | 0,003  | Yes         |
| M-21 vs. M-23   | 0,565  | 10 | 5,23   | 0,013  | Yes         |
| M-21 vs. B-414  | 0,424  | 10 | 3,922  | 0,16   | No          |
| M-21 vs. M-432  | 0,242  | 10 | 2,243  | 0,852  | Do Not Test |
| M-21 vs. B-423  | 0,141  | 10 | 1,308  | 0,995  | Do Not Test |
| M-21 vs. B-422  | 0,0263 | 10 | 0,244  | 1      | Do Not Test |
| B-422 vs. B-SC  | 1,627  | 10 | 15,06  | <0,001 | Yes         |
| B-422 vs. M-31  | 0,599  | 10 | 5,548  | 0,006  | Yes         |
| B-422 vs. M-23  | 0,539  | 10 | 4,986  | 0,022  | Yes         |
| B-422 vs. B-414 | 0,397  | 10 | 3,678  | 0,231  | Do Not Test |
| B-422 vs. M-432 | 0,216  | 10 | 1,999  | 0,92   | Do Not Test |
| B-422 vs. B-423 | 0,115  | 10 | 1,064  | 0,999  | Do Not Test |
| B-423 vs. B-SC  | 1,512  | 10 | 13,996 | <0,001 | Yes         |
| B-423 vs. M-31  | 0,484  | 10 | 4,483  | 0,06   | No          |
| B-423 vs. M-23  | 0,424  | 10 | 3,922  | 0,16   | Do Not Test |
| B-423 vs. B-414 | 0,282  | 10 | 2,613  | 0,703  | Do Not Test |
| B-423 vs. M-432 | 0,101  | 10 | 0,935  | 1      | Do Not Test |
| M-432 vs. B-SC  | 1,411  | 10 | 13,061 | <0,001 | Yes         |
| M-432 vs. M-31  | 0,383  | 10 | 3,548  | 0,277  | Do Not Test |
| M-432 vs. M-23  | 0,323  | 10 | 2,987  | 0,524  | Do Not Test |
| M-432 vs. B-414 | 0,181  | 10 | 1,678  | 0,973  | Do Not Test |
| B-414 vs. B-SC  | 1,23   | 10 | 11,382 | <0,001 | Yes         |
| B-414 vs. M-31  | 0,202  | 10 | 1,87   | 0,946  | Do Not Test |
| B-414 vs. M-23  | 0,141  | 10 | 1,308  | 0,995  | Do Not Test |
| M-23 vs. B-SC   | 1,088  | 10 | 10,074 | <0,001 | Yes         |
| M-23 vs. M-31   | 0,0607 | 10 | 0,562  | 1      | Do Not Test |
| M-31 vs. B-SC   | 1,028  | 10 | 9,512  | <0,001 | Yes         |

Tabela 19 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - Microrganismos com Caldo Nutriente + Nitrato de Cálcio

| Comparação     | Diferença entre médias | p  | q     | P     | Limite de decisão P<0,05 |
|----------------|------------------------|----|-------|-------|--------------------------|
| M-23 vs. M-31  | 0,676                  | 10 | 6,257 | 0,001 | Yes                      |
| M-23 vs. M-12  | 0,618                  | 10 | 5,72  | 0,004 | Yes                      |
| M-23 vs. B-SC  | 0,592                  | 10 | 5,477 | 0,007 | Yes                      |
| M-23 vs. M-21  | 0,47                   | 10 | 4,347 | 0,077 | No                       |
| M-23 vs. B-414 | 0,402                  | 10 | 3,718 | 0,218 | Do Not Test              |
| M-23 vs. B-424 | 0,324                  | 10 | 2,996 | 0,519 | Do Not Test              |
| M-23 vs. B-423 | 0,255                  | 10 | 2,363 | 0,809 | Do Not Test              |

|                 |        |    |        |       |             |
|-----------------|--------|----|--------|-------|-------------|
| M-23 vs. M-432  | 0,245  | 10 | 2,265  | 0,844 | Do Not Test |
| M-23 vs. B-422  | 0,185  | 10 | 1,716  | 0,969 | Do Not Test |
| B-422 vs. M-31  | 0,491  | 10 | 4,542  | 0,054 | No          |
| B-422 vs. M-12  | 0,433  | 10 | 4,005  | 0,14  | Do Not Test |
| B-422 vs. B-SC  | 0,406  | 10 | 3,761  | 0,205 | Do Not Test |
| B-422 vs. M-21  | 0,284  | 10 | 2,632  | 0,695 | Do Not Test |
| B-422 vs. B-414 | 0,216  | 10 | 2,002  | 0,919 | Do Not Test |
| B-422 vs. B-424 | 0,138  | 10 | 1,28   | 0,996 | Do Not Test |
| B-422 vs. B-423 | 0,07   | 10 | 0,648  | 1     | Do Not Test |
| B-422 vs. M-432 | 0,0593 | 10 | 0,549  | 1     | Do Not Test |
| M-432 vs. M-31  | 0,431  | 10 | 3,993  | 0,143 | Do Not Test |
| M-432 vs. M-12  | 0,373  | 10 | 3,456  | 0,312 | Do Not Test |
| M-432 vs. B-SC  | 0,347  | 10 | 3,212  | 0,417 | Do Not Test |
| M-432 vs. M-21  | 0,225  | 10 | 2,083  | 0,9   | Do Not Test |
| M-432 vs. B-414 | 0,157  | 10 | 1,453  | 0,99  | Do Not Test |
| M-432 vs. B-424 | 0,079  | 10 | 0,731  | 1     | Do Not Test |
| M-432 vs. B-423 | 0,0107 | 10 | 0,0987 | 1     | Do Not Test |
| B-423 vs. M-31  | 0,421  | 10 | 3,894  | 0,167 | Do Not Test |
| B-423 vs. M-12  | 0,363  | 10 | 3,357  | 0,353 | Do Not Test |
| B-423 vs. B-SC  | 0,336  | 10 | 3,113  | 0,463 | Do Not Test |
| B-423 vs. M-21  | 0,214  | 10 | 1,984  | 0,924 | Do Not Test |
| B-423 vs. B-414 | 0,146  | 10 | 1,355  | 0,994 | Do Not Test |
| B-423 vs. B-424 | 0,0683 | 10 | 0,633  | 1     | Do Not Test |
| B-424 vs. M-31  | 0,352  | 10 | 3,261  | 0,395 | Do Not Test |
| B-424 vs. M-12  | 0,294  | 10 | 2,724  | 0,651 | Do Not Test |
| B-424 vs. B-SC  | 0,268  | 10 | 2,481  | 0,762 | Do Not Test |
| B-424 vs. M-21  | 0,146  | 10 | 1,351  | 0,994 | Do Not Test |
| B-424 vs. B-414 | 0,078  | 10 | 0,722  | 1     | Do Not Test |
| B-414 vs. M-31  | 0,274  | 10 | 2,539  | 0,736 | Do Not Test |
| B-414 vs. M-12  | 0,216  | 10 | 2,002  | 0,919 | Do Not Test |
| B-414 vs. B-SC  | 0,19   | 10 | 1,759  | 0,963 | Do Not Test |
| B-414 vs. M-21  | 0,068  | 10 | 0,629  | 1     | Do Not Test |
| M-21 vs. M-31   | 0,206  | 10 | 1,91   | 0,939 | Do Not Test |
| M-21 vs. M-12   | 0,148  | 10 | 1,373  | 0,993 | Do Not Test |
| M-21 vs. B-SC   | 0,122  | 10 | 1,129  | 0,999 | Do Not Test |
| B-SC vs. M-31   | 0,0843 | 10 | 0,781  | 1     | Do Not Test |
| B-SC vs. M-12   | 0,0263 | 10 | 0,244  | 1     | Do Not Test |
| M-12 vs. M-31   | 0,058  | 10 | 0,537  | 1     | Do Not Test |

Tabela 20 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - Microrganismos com Caldo Nutriente + Acetato de Cálcio

| Comparação      | Diferença entre médias | p  | q       | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|----|---------|--------|--------------------------|
| B-422 vs. B-414 | 2,407                  | 10 | 22,283  | <0,001 | Yes                      |
| B-422 vs. M-31  | 2,391                  | 10 | 22,132  | <0,001 | Yes                      |
| B-422 vs. B-SC  | 2,347                  | 10 | 21,722  | <0,001 | Yes                      |
| B-422 vs. M-23  | 0,374                  | 10 | 3,465   | 0,309  | No                       |
| B-422 vs. B-424 | 0,361                  | 10 | 3,342   | 0,359  | Do Not Test              |
| B-422 vs. M-21  | 0,167                  | 10 | 1,543   | 0,985  | Do Not Test              |
| B-422 vs. M-12  | 0,126                  | 10 | 1,166   | 0,998  | Do Not Test              |
| B-422 vs. M-432 | 0,126                  | 10 | 1,163   | 0,998  | Do Not Test              |
| B-422 vs. B-423 | 0,0923                 | 10 | 0,855   | 1      | Do Not Test              |
| B-423 vs. B-414 | 2,315                  | 10 | 21,428  | <0,001 | Yes                      |
| B-423 vs. M-31  | 2,299                  | 10 | 21,277  | <0,001 | Yes                      |
| B-423 vs. B-SC  | 2,254                  | 10 | 20,867  | <0,001 | Yes                      |
| B-423 vs. M-23  | 0,282                  | 10 | 2,61    | 0,705  | Do Not Test              |
| B-423 vs. B-424 | 0,269                  | 10 | 2,487   | 0,759  | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-21  | 0,0743                 | 10 | 0,688   | 1      | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-12  | 0,0337                 | 10 | 0,312   | 1      | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-432 | 0,0333                 | 10 | 0,309   | 1      | Do Not Test              |
| M-432 vs. B-414 | 2,282                  | 10 | 21,12   | <0,001 | Yes                      |
| M-432 vs. M-31  | 2,265                  | 10 | 20,969  | <0,001 | Yes                      |
| M-432 vs. B-SC  | 2,221                  | 10 | 20,558  | <0,001 | Yes                      |
| M-432 vs. M-23  | 0,249                  | 10 | 2,302   | 0,832  | Do Not Test              |
| M-432 vs. B-424 | 0,235                  | 10 | 2,178   | 0,872  | Do Not Test              |
| M-432 vs. M-21  | 0,041                  | 10 | 0,38    | 1      | Do Not Test              |
| M-432 vs. M-12  | 0,000333               | 10 | 0,00309 | 1      | Do Not Test              |
| M-12 vs. B-414  | 2,281                  | 10 | 21,117  | <0,001 | Yes                      |
| M-12 vs. M-31   | 2,265                  | 10 | 20,966  | <0,001 | Yes                      |
| M-12 vs. B-SC   | 2,221                  | 10 | 20,555  | <0,001 | Yes                      |
| M-12 vs. M-23   | 0,248                  | 10 | 2,299   | 0,833  | Do Not Test              |
| M-12 vs. B-424  | 0,235                  | 10 | 2,175   | 0,873  | Do Not Test              |
| M-12 vs. M-21   | 0,0407                 | 10 | 0,376   | 1      | Do Not Test              |
| M-21 vs. B-414  | 2,241                  | 10 | 20,74   | <0,001 | Yes                      |
| M-21 vs. M-31   | 2,224                  | 10 | 20,589  | <0,001 | Yes                      |
| M-21 vs. B-SC   | 2,18                   | 10 | 20,179  | <0,001 | Yes                      |
| M-21 vs. M-23   | 0,208                  | 10 | 1,922   | 0,937  | Do Not Test              |
| M-21 vs. B-424  | 0,194                  | 10 | 1,799   | 0,958  | Do Not Test              |
| B-424 vs. B-414 | 2,046                  | 10 | 18,942  | <0,001 | Yes                      |
| B-424 vs. M-31  | 2,03                   | 10 | 18,79   | <0,001 | Yes                      |
| B-424 vs. B-SC  | 1,986                  | 10 | 18,38   | <0,001 | Yes                      |

|                |        |    |        |        |             |
|----------------|--------|----|--------|--------|-------------|
| B-424 vs. M-23 | 0,0133 | 10 | 0,123  | 1      | Do Not Test |
| M-23 vs. B-414 | 2,033  | 10 | 18,818 | <0,001 | Yes         |
| M-23 vs. M-31  | 2,017  | 10 | 18,667 | <0,001 | Yes         |
| M-23 vs. B-SC  | 1,972  | 10 | 18,257 | <0,001 | Yes         |
| B-SC vs. B-414 | 0,0607 | 10 | 0,562  | 1      | No          |
| B-SC vs. M-31  | 0,0443 | 10 | 0,41   | 1      | Do Not Test |
| M-31 vs. B-414 | 0,0163 | 10 | 0,151  | 1      | Do Not Test |

Tabela 21 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - Microrganismos com Caldo Nutriente + Cloreto de Cálcio

| Comparação      | Diferença entre médias | p  | q      | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|----|--------|--------|--------------------------|
| M-12 vs. B-SC   | 2,113                  | 10 | 19,556 | <0,001 | Yes                      |
| M-12 vs. M-23   | 0,788                  | 10 | 7,297  | <0,001 | Yes                      |
| M-12 vs. M-31   | 0,505                  | 10 | 4,678  | 0,041  | Yes                      |
| M-12 vs. M-432  | 0,385                  | 10 | 3,567  | 0,27   | No                       |
| M-12 vs. B-414  | 0,367                  | 10 | 3,4    | 0,335  | Do Not Test              |
| M-12 vs. M-21   | 0,191                  | 10 | 1,771  | 0,962  | Do Not Test              |
| M-12 vs. B-422  | 0,182                  | 10 | 1,685  | 0,972  | Do Not Test              |
| M-12 vs. B-424  | 0,18                   | 10 | 1,669  | 0,974  | Do Not Test              |
| M-12 vs. B-423  | 0,109                  | 10 | 1,012  | 0,999  | Do Not Test              |
| B-423 vs. B-SC  | 2,003                  | 10 | 18,544 | <0,001 | Yes                      |
| B-423 vs. M-23  | 0,679                  | 10 | 6,285  | 0,001  | Yes                      |
| B-423 vs. M-31  | 0,396                  | 10 | 3,666  | 0,235  | No                       |
| B-423 vs. M-432 | 0,276                  | 10 | 2,555  | 0,73   | Do Not Test              |
| B-423 vs. B-414 | 0,258                  | 10 | 2,388  | 0,799  | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-21  | 0,082                  | 10 | 0,759  | 1      | Do Not Test              |
| B-423 vs. B-422 | 0,0727                 | 10 | 0,673  | 1      | Do Not Test              |
| B-423 vs. B-424 | 0,071                  | 10 | 0,657  | 1      | Do Not Test              |
| B-424 vs. B-SC  | 1,932                  | 10 | 17,886 | <0,001 | Yes                      |
| B-424 vs. M-23  | 0,608                  | 10 | 5,628  | 0,005  | Yes                      |
| B-424 vs. M-31  | 0,325                  | 10 | 3,008  | 0,513  | Do Not Test              |
| B-424 vs. M-432 | 0,205                  | 10 | 1,898  | 0,941  | Do Not Test              |
| B-424 vs. B-414 | 0,187                  | 10 | 1,731  | 0,967  | Do Not Test              |
| B-424 vs. M-21  | 0,011                  | 10 | 0,102  | 1      | Do Not Test              |
| B-424 vs. B-422 | 0,00167                | 10 | 0,0154 | 1      | Do Not Test              |
| B-422 vs. B-SC  | 1,931                  | 10 | 17,871 | <0,001 | Yes                      |
| B-422 vs. M-23  | 0,606                  | 10 | 5,612  | 0,005  | Yes                      |
| B-422 vs. M-31  | 0,323                  | 10 | 2,993  | 0,521  | Do Not Test              |
| B-422 vs. M-432 | 0,203                  | 10 | 1,882  | 0,944  | Do Not Test              |

|                 |         |    |        |        |             |
|-----------------|---------|----|--------|--------|-------------|
| B-422 vs. B-414 | 0,185   | 10 | 1,716  | 0,969  | Do Not Test |
| B-422 vs. M-21  | 0,00933 | 10 | 0,0864 | 1      | Do Not Test |
| M-21 vs. B-SC   | 1,921   | 10 | 17,785 | <0,001 | Yes         |
| M-21 vs. M-23   | 0,597   | 10 | 5,526  | 0,006  | Yes         |
| M-21 vs. M-31   | 0,314   | 10 | 2,906  | 0,563  | Do Not Test |
| M-21 vs. M-432  | 0,194   | 10 | 1,796  | 0,958  | Do Not Test |
| M-21 vs. B-414  | 0,176   | 10 | 1,629  | 0,978  | Do Not Test |
| B-414 vs. B-SC  | 1,745   | 10 | 16,155 | <0,001 | Yes         |
| B-414 vs. M-23  | 0,421   | 10 | 3,897  | 0,167  | No          |
| B-414 vs. M-31  | 0,138   | 10 | 1,277  | 0,996  | Do Not Test |
| B-414 vs. M-432 | 0,018   | 10 | 0,167  | 1      | Do Not Test |
| M-432 vs. B-SC  | 1,727   | 10 | 15,989 | <0,001 | Yes         |
| M-432 vs. M-23  | 0,403   | 10 | 3,73   | 0,215  | Do Not Test |
| M-432 vs. M-31  | 0,12    | 10 | 1,111  | 0,999  | Do Not Test |
| M-31 vs. B-SC   | 1,607   | 10 | 14,878 | <0,001 | Yes         |
| M-31 vs. M-23   | 0,283   | 10 | 2,62   | 0,7    | Do Not Test |
| M-23 vs. B-SC   | 1,324   | 10 | 12,259 | <0,001 | Yes         |



## APÊNDICE IV - TESTE DE HIDRÓLISE DA UREIA

O teste determinou a capacidade dos microrganismos de degradar a ureia através da enzima urease. Quando a ureia é degradada pela urease a amônia acumula-se no meio tornando-o alcalino, e o meio por conter o indicador de pH vermelho de fenol muda a coloração de amarelo para rosa. Para os microrganismos utilizados neste trabalho, nenhum apresentou urease ativa, como ilustram as Figura 62 e Figura 63.

Figura 62 - Tubos com ureia a esquerda e ilustração do resultado negativo e positivo a direita

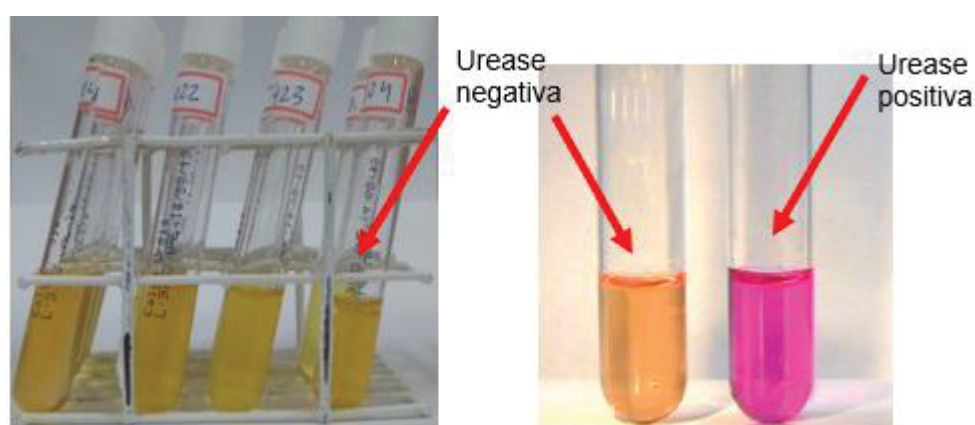
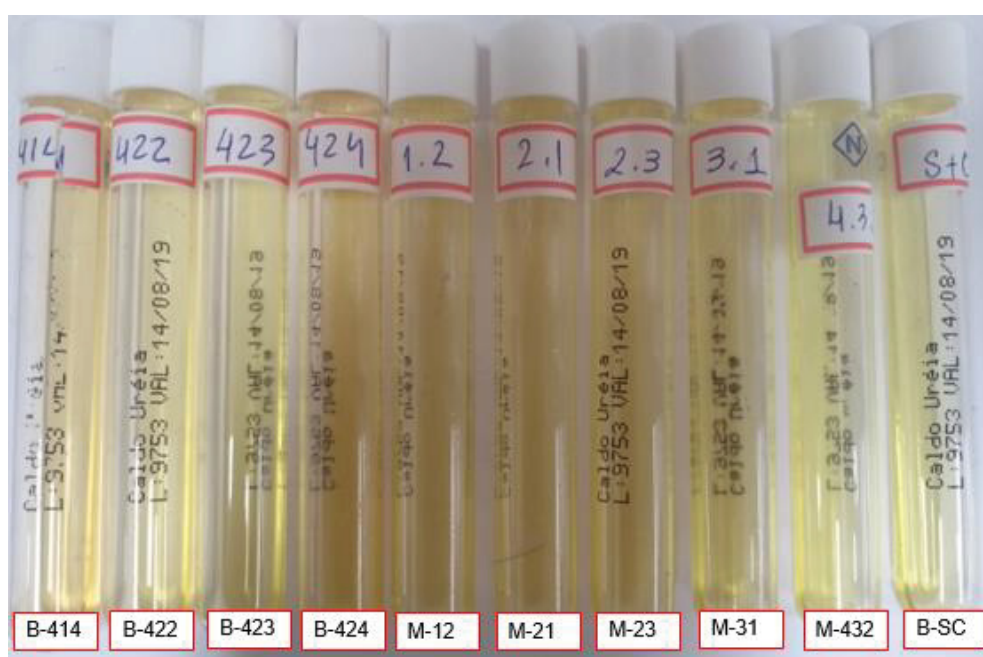


Figura 63 - Resultado do teste de urease no microrganismos utilizados neste trabalho



## APÊNDICE V - LEITURAS (ESPECTROFOTÔMETRO) E ESTATÍSTICAS (TESTE DE NORMALIDADE, ANÁLISE DE VARIÂNCIA E TESTE DE TUKEY)

Tabela 22 - Leituras: Espectrofotômetro

| <b>Microrganismo</b> | <b>Caldo Nutriente</b> | <b>Lactato de Cálcio</b> | <b>Nitrato de Cálcio</b> | <b>Acetato de Cálcio</b> | <b>Cloreto de Cálcio</b> |
|----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| B-414                | 1,824                  | 1,854                    | 2,398                    | 0,216                    | 2,523                    |
|                      | 1,770                  | 2,097                    | 2,097                    | 0,201                    | 1,796                    |
|                      | 1,793                  | 1,824                    | 1,824                    | 0,218                    | 2,700                    |
| B-422                | 1,886                  | 2,523                    | 2,700                    | 2,700                    | 2,525                    |
|                      | 1,921                  | 2,046                    | 2,222                    | 2,523                    | 2,528                    |
|                      | 1,721                  | 2,398                    | 2,046                    | 2,634                    | 2,522                    |
| B-423                | 2,155                  | 2,523                    | 2,205                    | 2,545                    | 2,446                    |
|                      | 2,150                  | 2,002                    | 2,398                    | 2,523                    | 2,702                    |
|                      | 2,046                  | 2,097                    | 2,155                    | 2,512                    | 2,645                    |
| B-424                | 2,046                  | 2,523                    | 2,301                    | 2,145                    | 2,523                    |
|                      | 2,097                  | 2,398                    | 2,398                    | 2,398                    | 2,456                    |
|                      | 2,087                  | 2,390                    | 1,854                    | 2,231                    | 2,601                    |
| M-12                 | 2,046                  | 2,673                    | 1,887                    | 2,523                    | 2,765                    |
|                      | 1,959                  | 2,097                    | 1,959                    | 2,500                    | 2,789                    |
|                      | 2,097                  | 2,798                    | 1,824                    | 2,456                    | 2,567                    |
| M-21                 | 2,097                  | 2,523                    | 2,097                    | 2,398                    | 2,462                    |
|                      | 1,796                  | 2,222                    | 2,222                    | 2,523                    | 2,599                    |
|                      | 1,638                  | 2,301                    | 1,796                    | 2,436                    | 2,486                    |
| M-23                 | 2,054                  | 2,398                    | 2,700                    | 2,222                    | 1,886                    |
|                      | 2,097                  | 1,509                    | 2,301                    | 2,345                    | 1,824                    |
|                      | 2,155                  | 1,444                    | 2,523                    | 2,167                    | 2,046                    |
| M-31                 | 0,061                  | 1,770                    | 1,854                    | 0,216                    | 2,155                    |
|                      | 0,079                  | 1,721                    | 1,721                    | 0,211                    | 2,119                    |
|                      | 0,080                  | 1,678                    | 1,921                    | 0,257                    | 2,331                    |
| M-432                | 1,854                  | 2,222                    | 2,155                    | 2,398                    | 2,398                    |
|                      | 1,824                  | 2,097                    | 2,398                    | 2,382                    | 2,222                    |
|                      | 1,830                  | 2,000                    | 2,237                    | 2,700                    | 2,345                    |
| B-SC                 | 1,111                  | 0,950                    | 1,770                    | 0,239                    | 0,525                    |
|                      | 1,058                  | 0,340                    | 2,301                    | 0,253                    | 0,46                     |
|                      | 1,098                  | 0,796                    | 1,678                    | 0,325                    | 0,798                    |

Fonte: O Autor

## APÊNDICE VI - DADOS DAS ANÁLISES INDIVIDUAIS DE CADA MICRORGANISMO (ESPECTROFOTÔMETRO, DRX E MEV)

### A. *Lysinibacillus sphaericus*

#### A.1. *Lysinibacillus sphaericus* INCQS-414 (B-414)

Figura 64 - Leituras Espetrofotômetro (B-414)

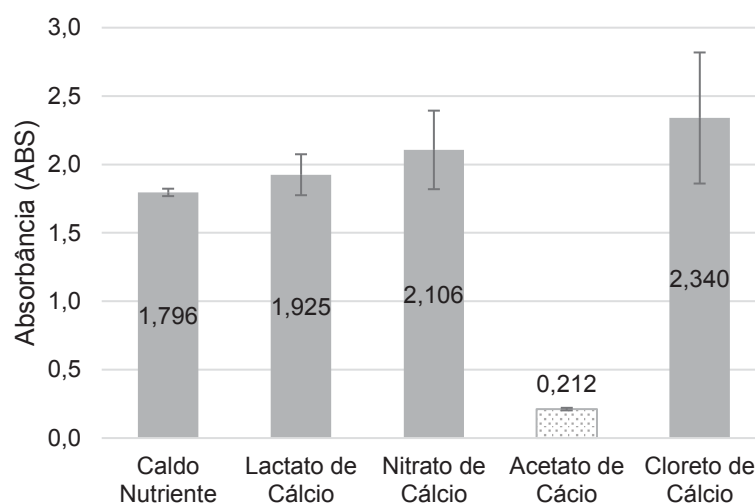


Figura 65 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo *Bacillus sphaericus* INCQS 414 na presença de Nitrato de Cálcio (N414), Lactato de Cálcio (L414) e Cloreto de Cálcio (C414)

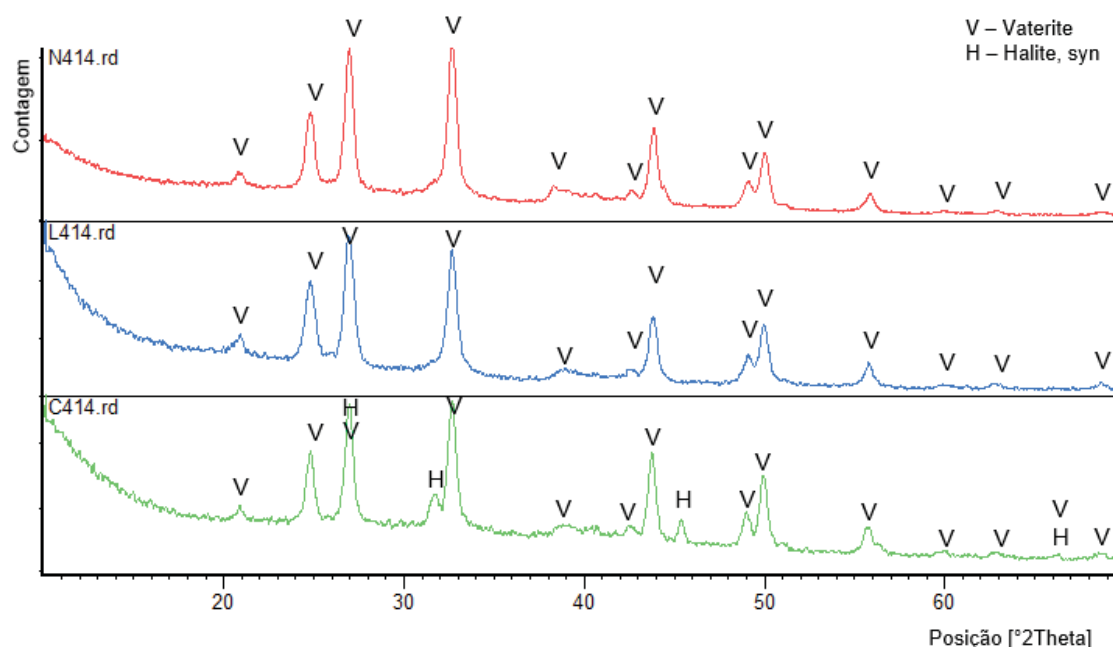
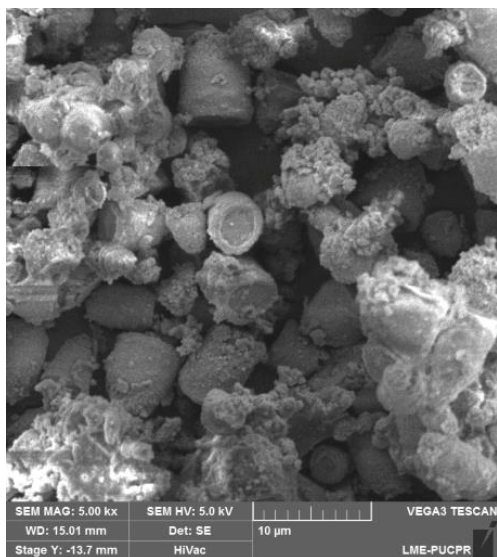


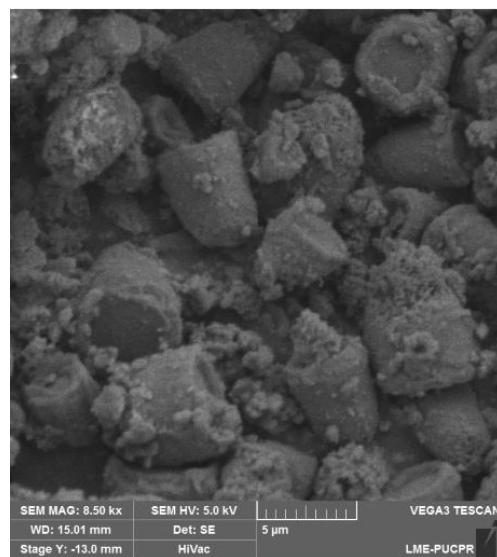
Tabela 23 - Compostos identificados do precipitado do *Bacillus sphaericus* INCQS 414

| Código de Referência | Nome do Composto    | Fórmula Química   | Mineral     |
|----------------------|---------------------|-------------------|-------------|
| 33-0268              | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Vaterita    |
| 05-0628              | Cloreto de Sódio    | NaCl              | Halita, syn |

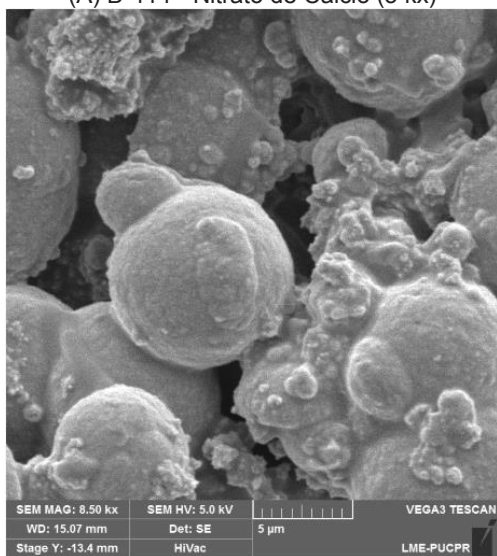
Figura 66 - MEV do B-414 variando o meio de cultura



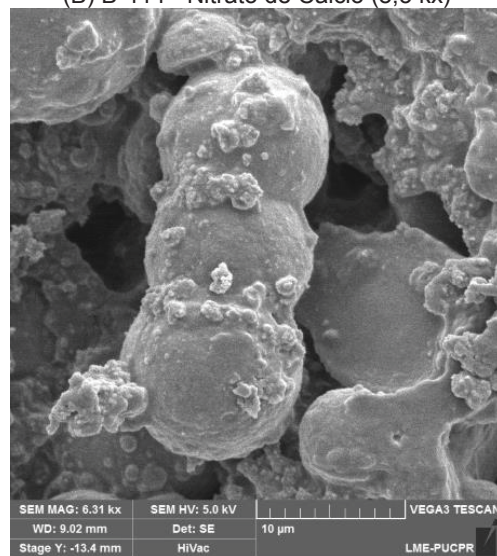
(A) B-414 - Nitrato de Cálcio (5 kx)



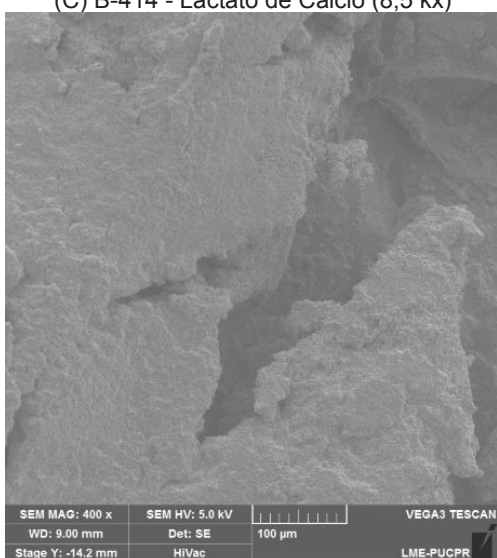
(B) B-414 - Nitrato de Cálcio (8,5 kx)



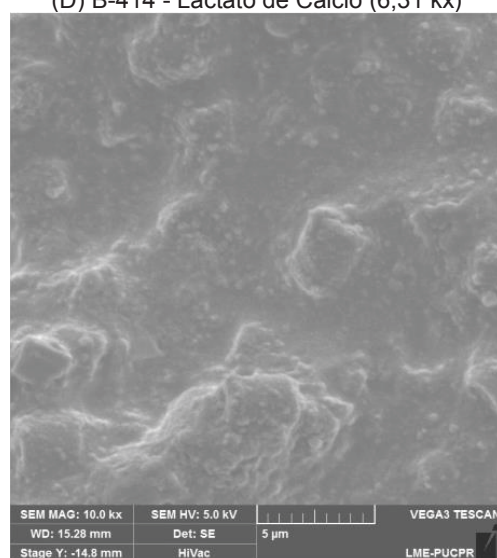
(C) B-414 - Lactato de Cálcio (8,5 kx)



(D) B-414 - Lactato de Cálcio (6,31 kx)



(E) B-414 - Cloreto de Cálcio (400 x)



(F) B-414 - Cloreto de Cálcio (10 kx)

## A.2. *Lysinibacillus sphaericus* INCQS-422 (B-422)

Figura 67 - Leituras Espectrofotômetro (B-422)

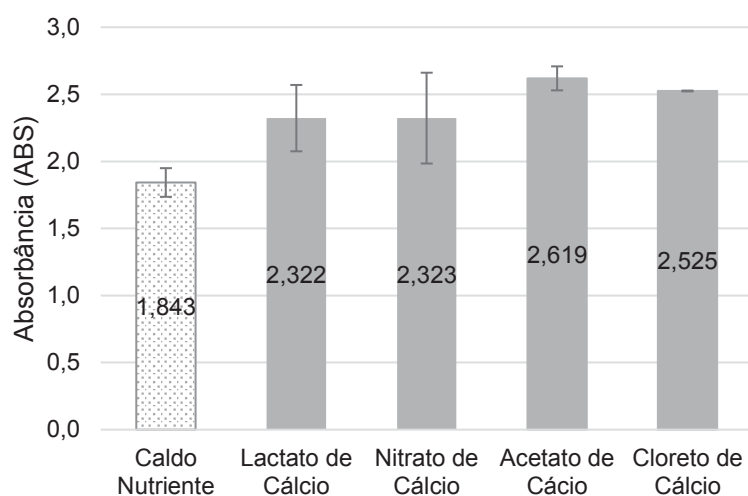


Figura 68 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo *Bacillus sphaericus* INCQS 422 na presença de Nitrato de Cálcio (N422), Acetato de Cálcio (A422), Lactato de Cálcio (L422) e Cloreto de Cálcio (C422)

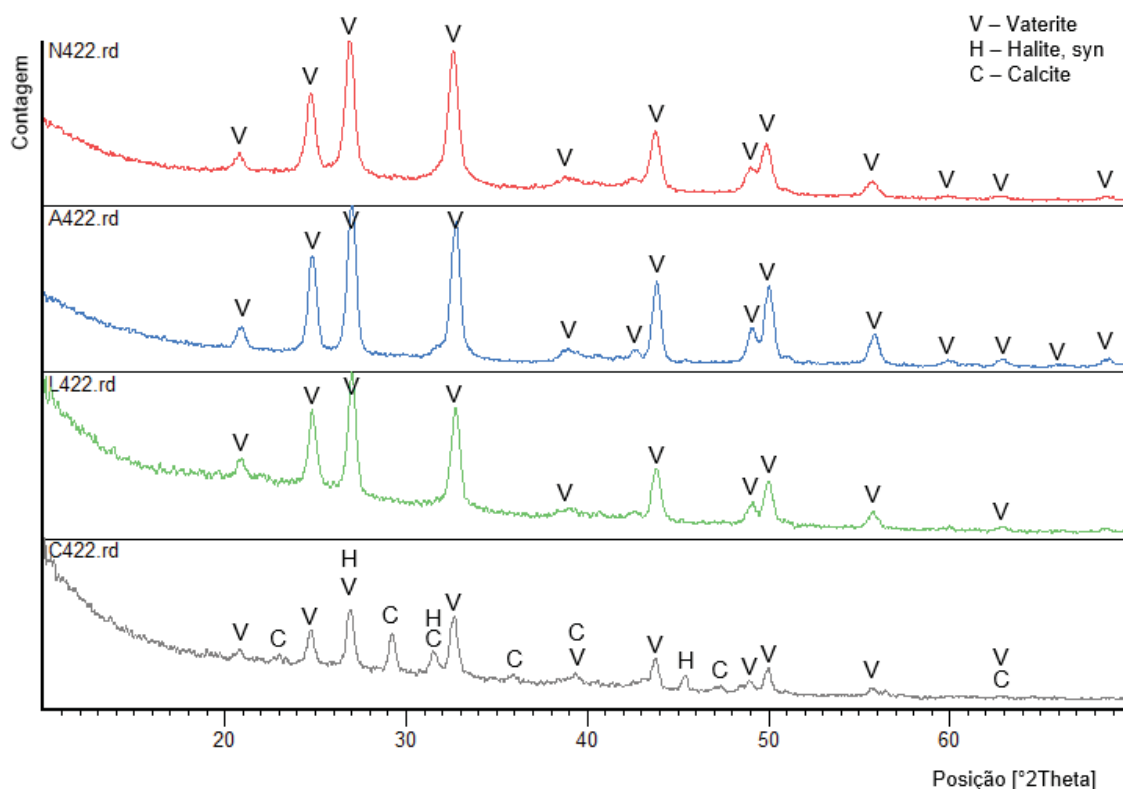
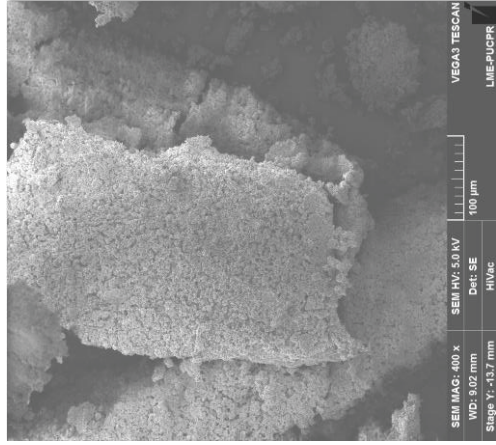


Tabela 24 - Compostos identificados do precipitado do *Bacillus sphaericus* INCQS 422

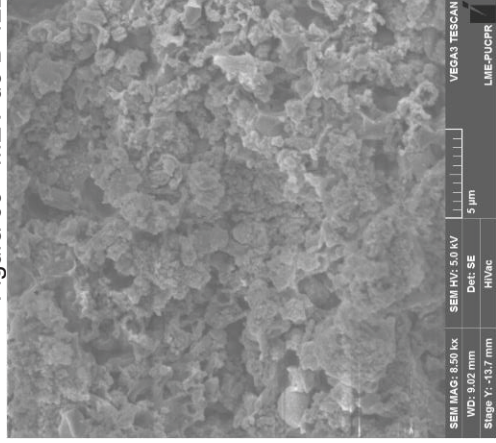
| Código de Referência | Nome do Composto    | Fórmula Química   | Mineral     |
|----------------------|---------------------|-------------------|-------------|
| 33-0268              | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Vaterita    |
| 05-0628              | Cloreto de Sódio    | NaCl              | Halita, syn |
| 47-1743              | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Calcita     |



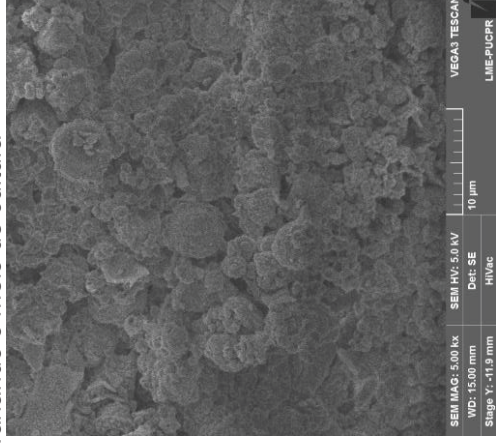
Figura 69 - MEV do B-422 variando o meio de cultura



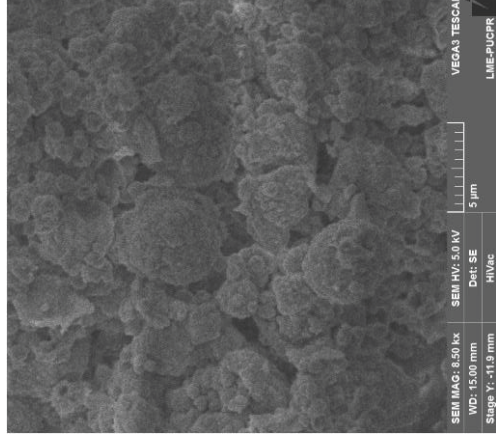
(A) B-422 - Nitrato de Cálcio (400 x)



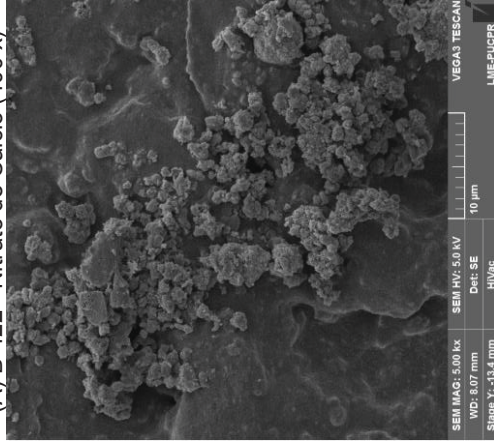
(B) B-422 - Nitrato de Cálcio (8,5 kx)



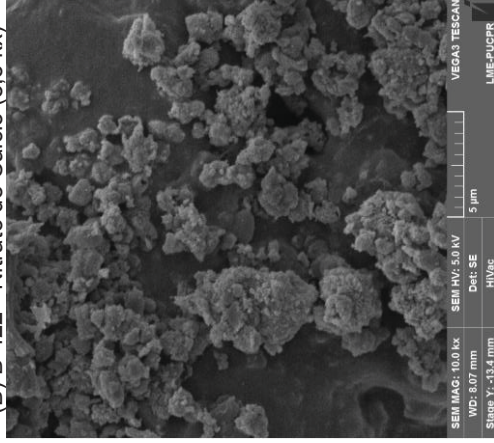
(C) B-422 - Acetato de Cálcio (5 kx)



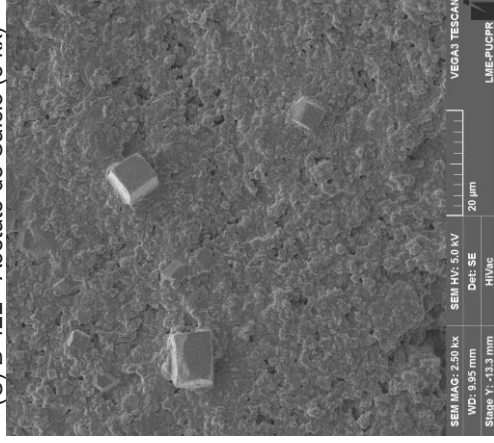
(D) B-422 - Acetato de Cálcio (8,5 kx)



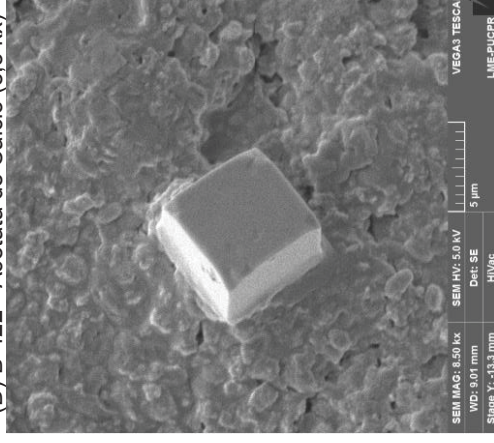
(E) B-422 - Lactato de Cálcio (5kx)



(F) B-422 - Lactato de Cálcio (10 kx)



(G) B-422 - Cloreto de Cálcio (2,5 kx)

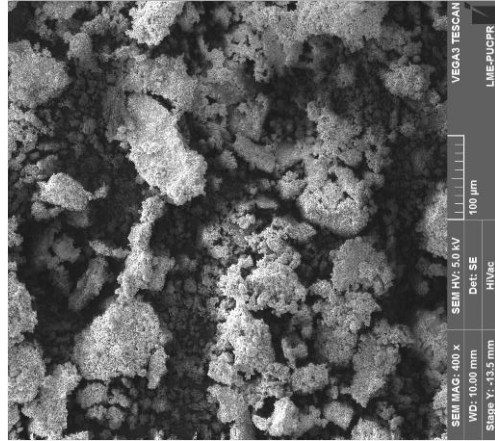


(H) B-422 - Cloreto de Cálcio (8,5 kx)

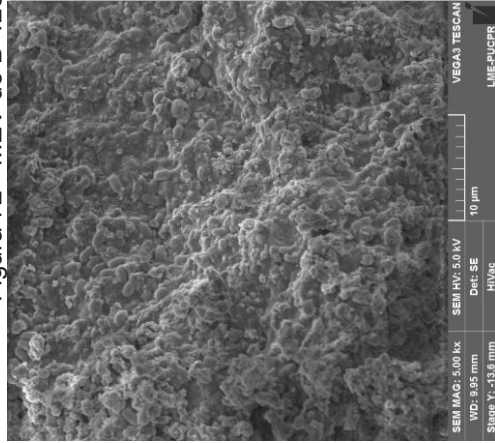




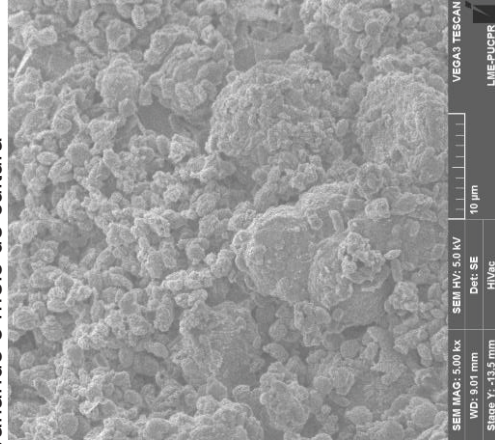
Figura 72 - MEV do B-423 variando o meio de cultura



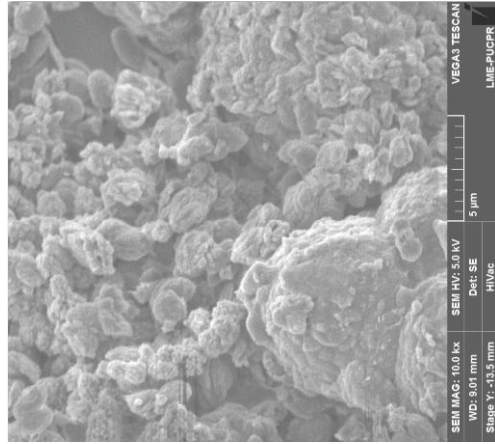
(A) Nitrato de Cálcio (400 x)



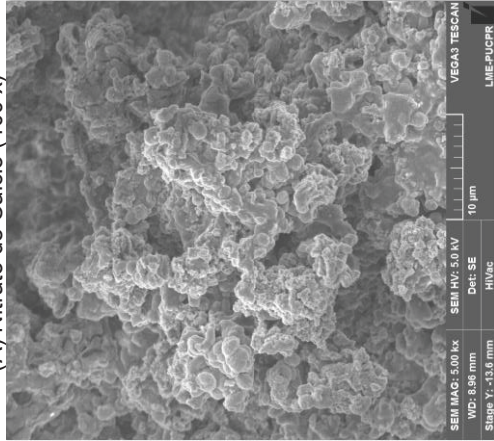
(B) Nitrato de Cálcio (5 kx)



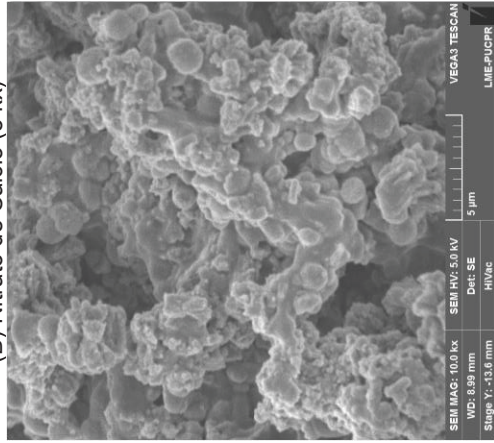
(C) Acetato de Cálcio (5 kx)



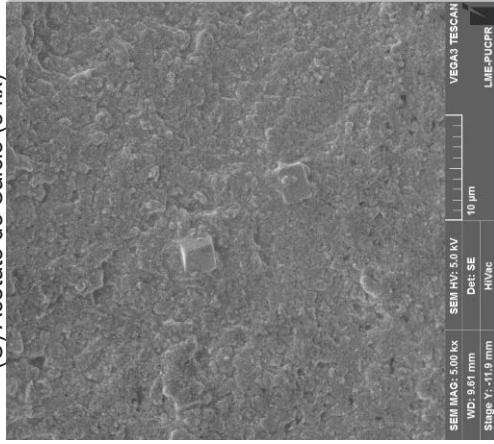
(D) Acetato de Cálcio (10 kx)



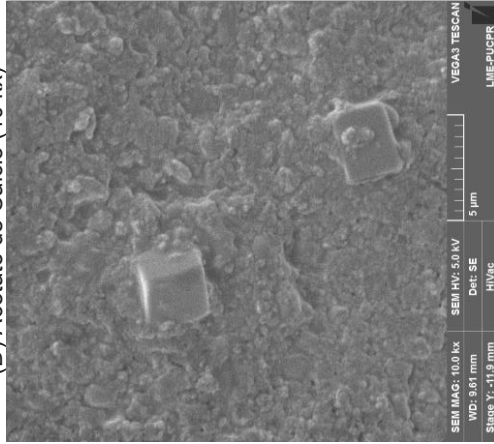
(E) Lactato de Cálcio (5 kx)



(F) Lactato de Cálcio (10 kx)



(G) Cloreto de Cálcio (5 kx)



(H) Cloreto de Cálcio (10 kx)

#### A.4. *Lysinibacillus sphaericus* INCQS-424 (B-424)

Figura 73 - Leituras Espectrofotômetro (B-424)

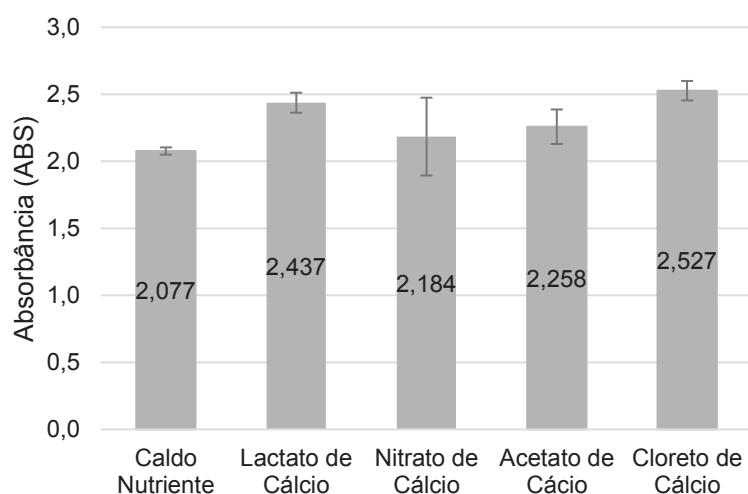


Figura 74 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo *Bacillus sphaericus* INCQS 424 na presença de Nitrato de Cálcio (N424), Acetato de Cálcio (A424), Lactato de Cálcio (L424) e Cloreto de Cálcio (C424)

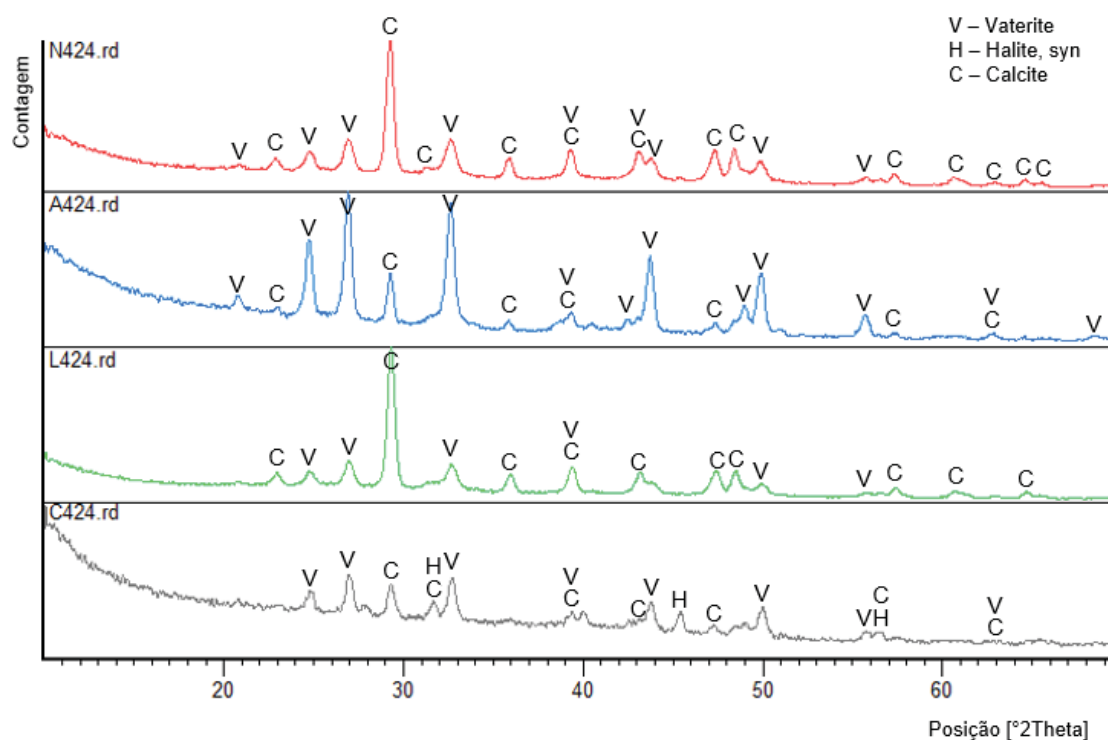
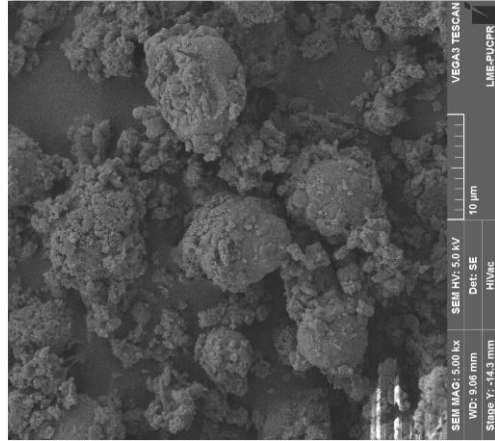


Tabela 26 - Compostos identificados do precipitado do *Bacillus sphaericus* INCQS 424

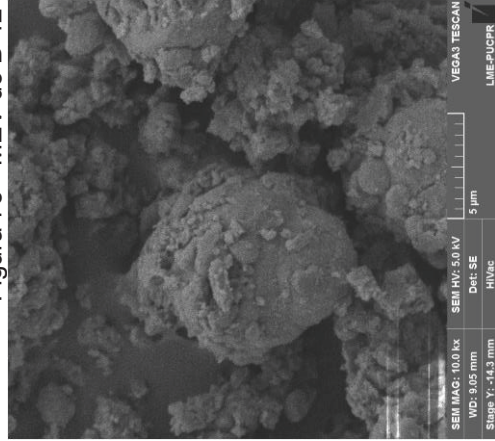
| Código de Referência | Nome do Composto    | Fórmula Química | Mineral     |
|----------------------|---------------------|-----------------|-------------|
| 33-0268              | Carbonato de Cálcio | $\text{CaCO}_3$ | Vaterita    |
| 05-0628              | Cloreto de Sódio    | $\text{NaCl}$   | Halita, syn |
| 47-1743              | Carbonato de Cálcio | $\text{CaCO}_3$ | Calcita     |



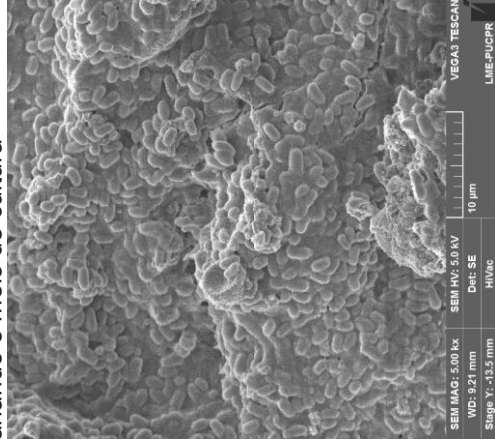
Figura 75 - MEV do B-424 variando o meio de cultura



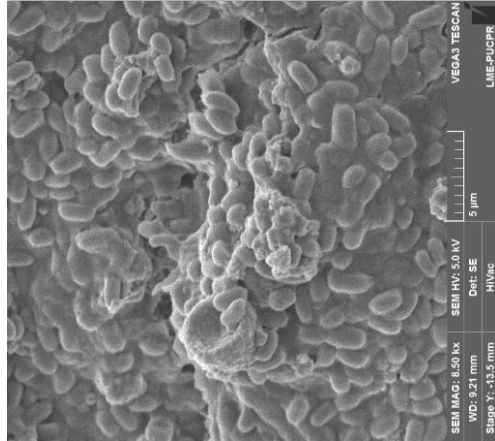
(A) Nitrato de Cálcio (5 kx)



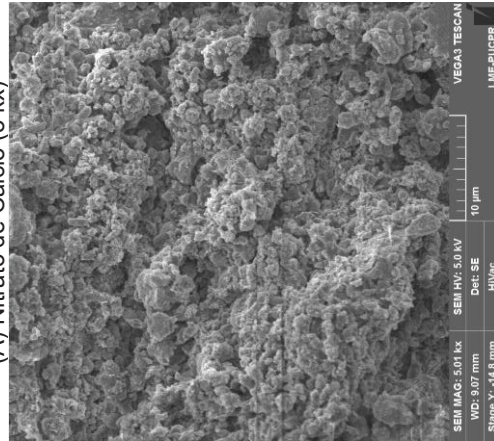
(B) Nitrato de Cálcio (10 kx)



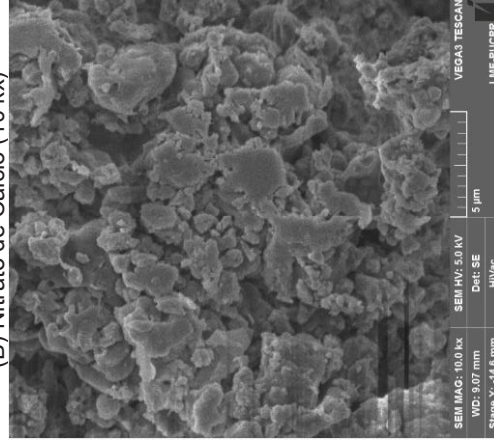
(C) Acetato de Cálcio (5 kx)



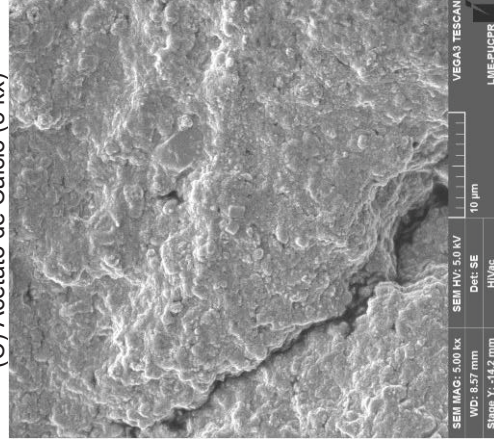
(D) Acetato de Cálcio (8.5 kx)



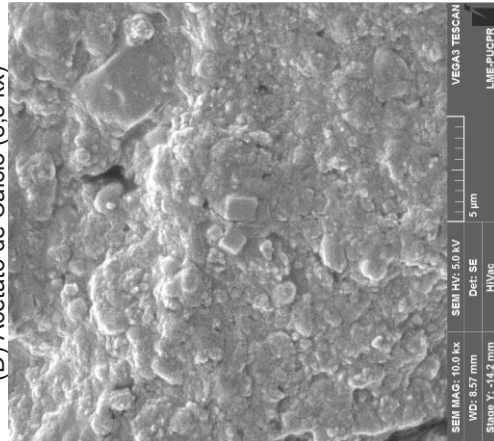
(E) Lactato de Cálcio (5 kx)



(F) Lactato de Cálcio (10 kx)



(G) Cloreto de Cálcio (5 kx)



(H) Cloreto de Cálcio (10 kx)

## B. Microrganismos marinhos

### B.1. Microrganismo marinho M-12

Figura 76 - Leitura Espectrofotômetro (M-12)

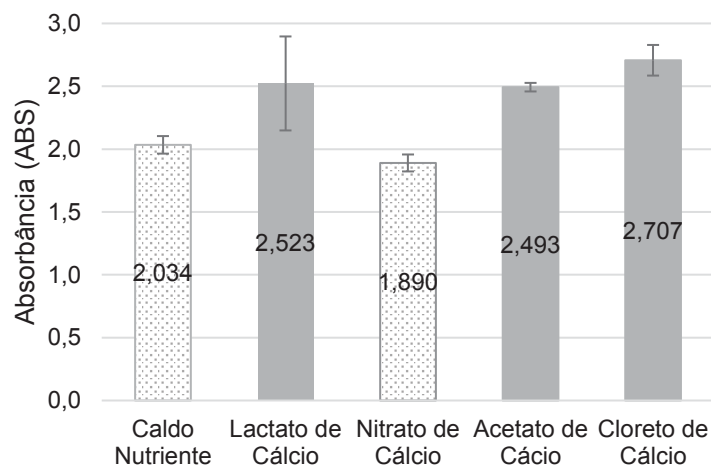


Figura 77 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo marinho denominado M-12 na presença de Nitrato de Cálcio (N12), Acetato de Cálcio (A12), Lactato de Cálcio (L12) e Cloreto de Cálcio (C12)

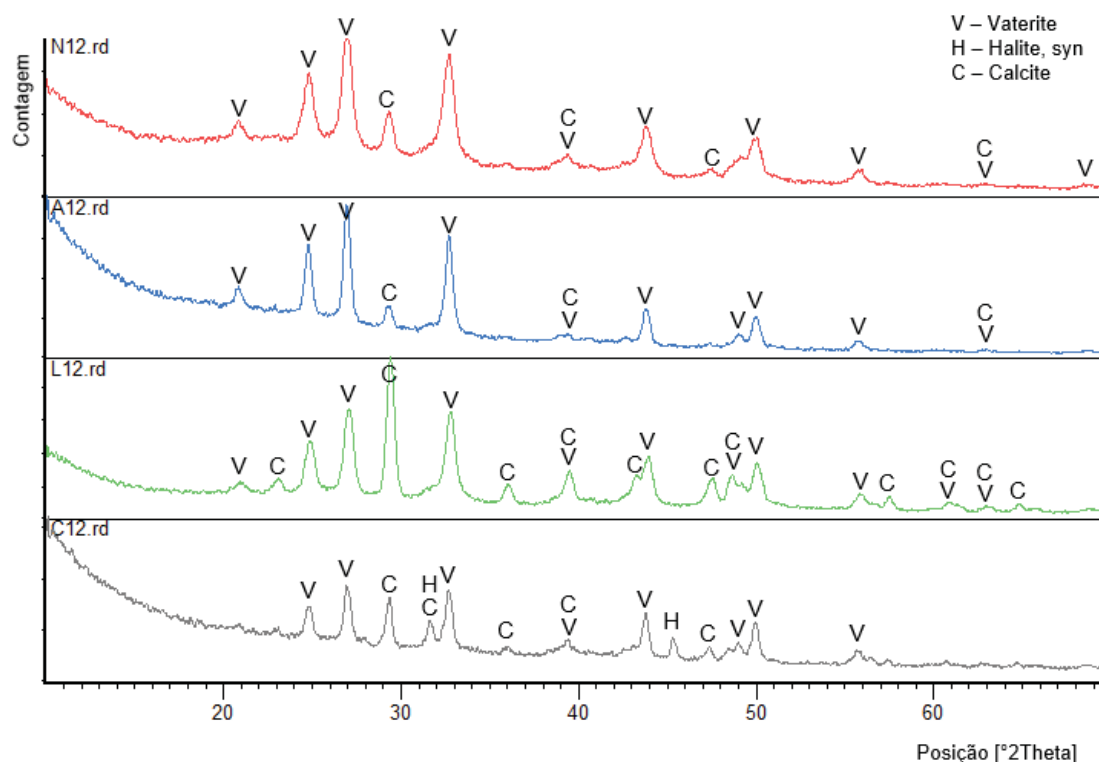
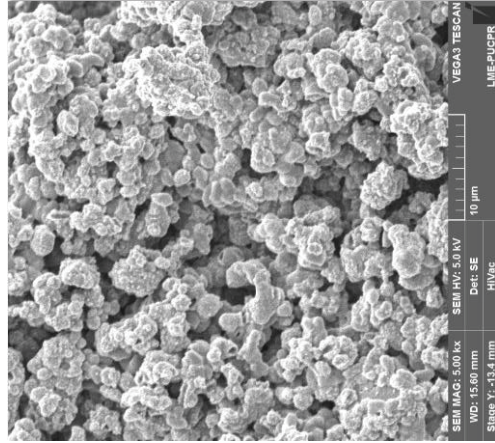


Tabela 27 - Compostos identificados do precipitado do microrganismo marinho M-12

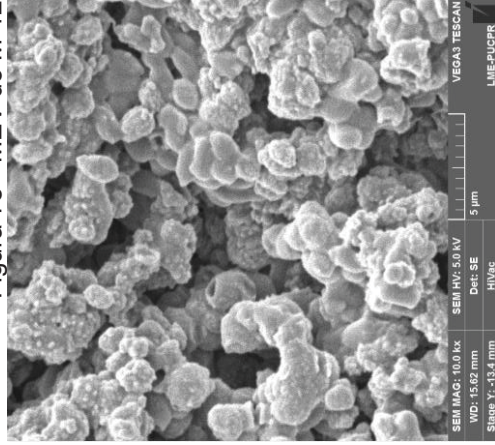
| Código de Referência | Nome do Composto    | Fórmula Química | Mineral     |
|----------------------|---------------------|-----------------|-------------|
| 33-0268              | Carbonato de Cálcio | $\text{CaCO}_3$ | Vaterita    |
| 05-0628              | Cloreto de Sódio    | $\text{NaCl}$   | Halita, syn |
| 47-1743              | Carbonato de Cálcio | $\text{CaCO}_3$ | Calcita     |



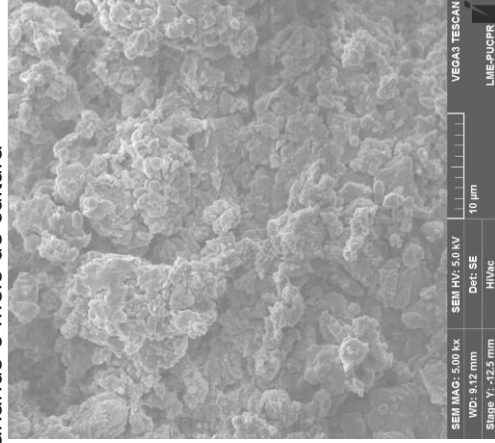
Figura 78 - MEV do M-12 variando o meio de cultura



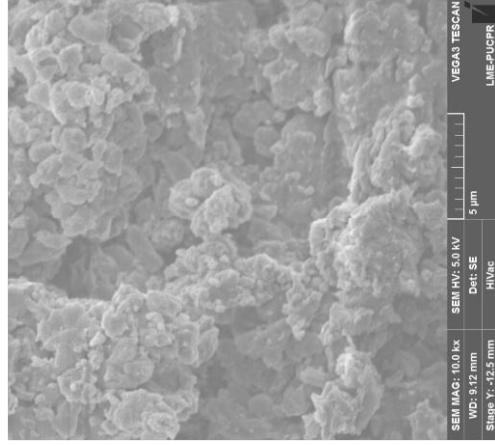
(A) Nitrate de Cálcio (5 kx)



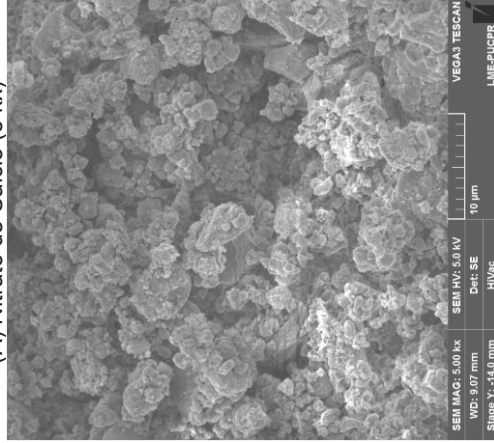
(B) Nitrate de Cálcio (10 kx)



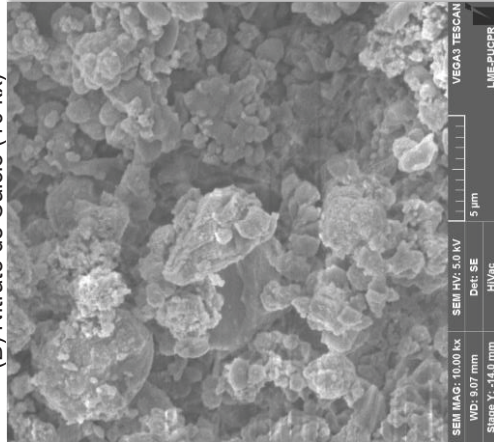
(C) Acetate de Cálcio (5 kx)



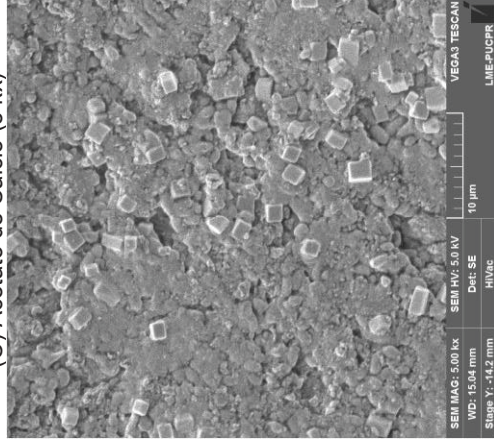
(D) Acetate de Cálcio (10 kx)



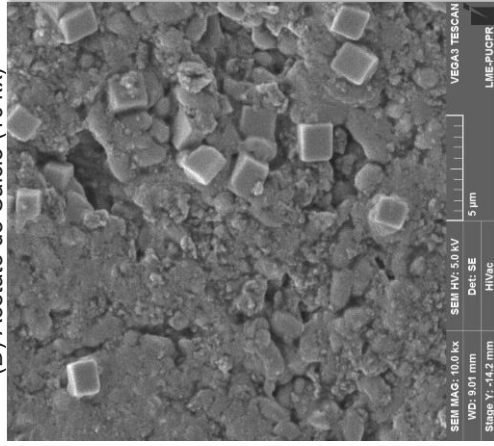
(E) Lactate de Cálcio (5 kx)



(F) Lactate de Cálcio (10 kx)



(G) Chloride de Cálcio (5 kx)



(H) Chloride de Cálcio (10 kx)

## B.2. Microrganismo marinho M-21

Figura 79 - Leitura Espectrofotômetro (M-21)

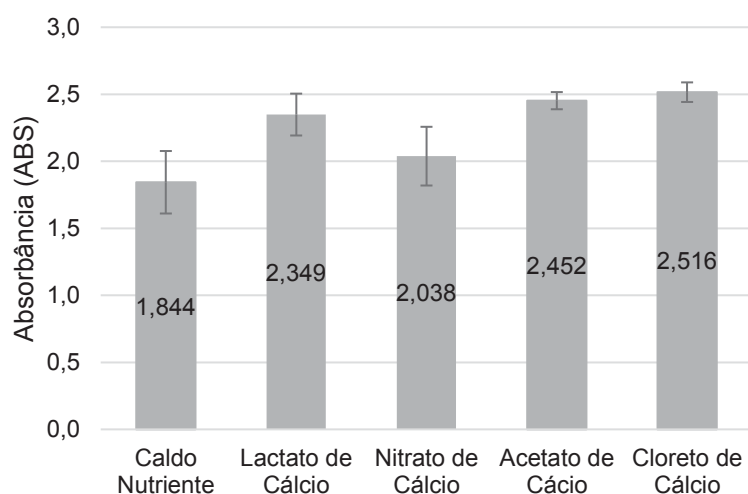


Figura 80 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo marinho denominado M-21 na presença de Nitrato de Cálcio (N21), Acetato de Cálcio (A21), Lactato de Cálcio (L21) e Cloreto de Cálcio (C21)

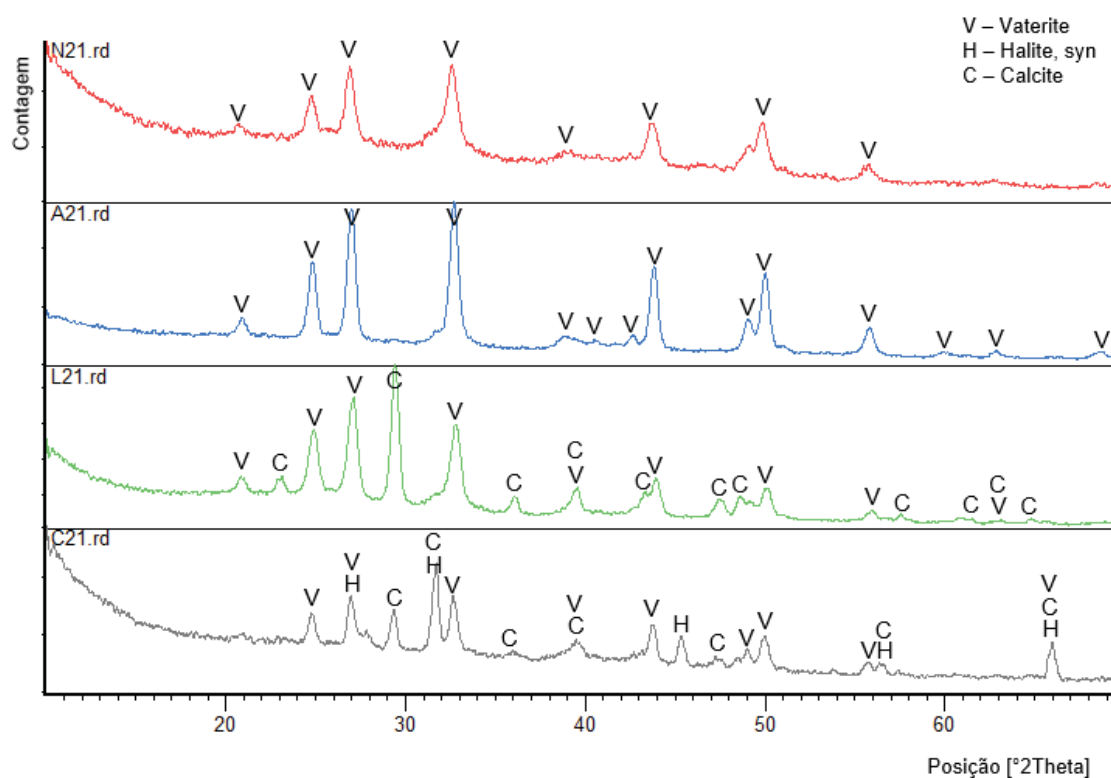
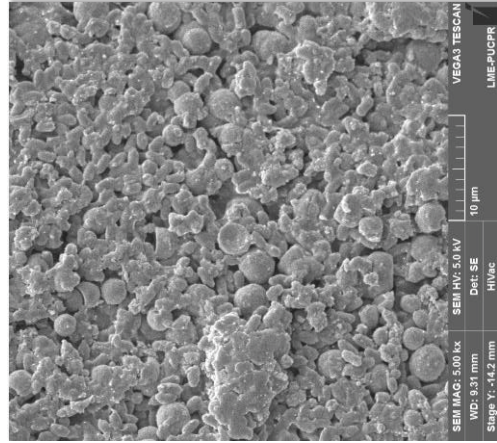


Tabela 28 - Compostos identificados do precipitado do microrganismo marinho M-21

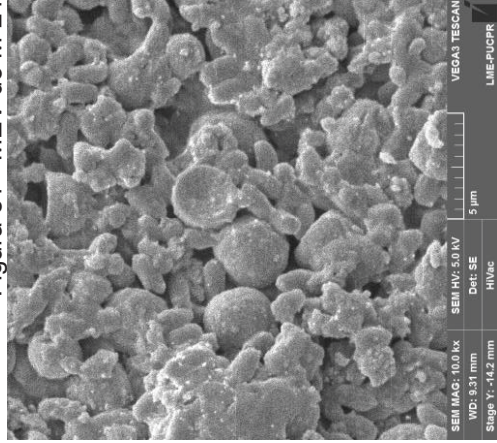
| Código de Referência | Nome do Composto    | Fórmula Química   | Mineral     |
|----------------------|---------------------|-------------------|-------------|
| 33-0268              | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Vaterita    |
| 05-0628              | Cloreto de Sódio    | NaCl              | Halita, syn |
| 47-1743              | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Calcita     |



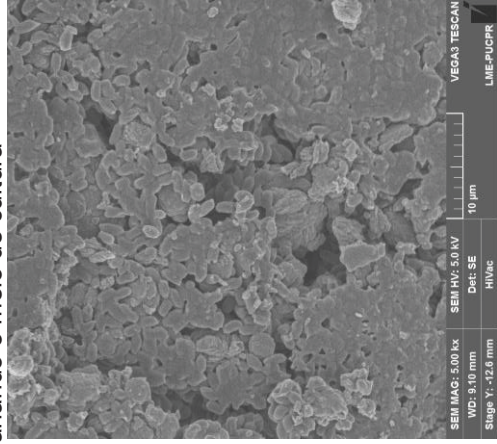
Figura 81 - MEV do M-21 variando o meio de cultura



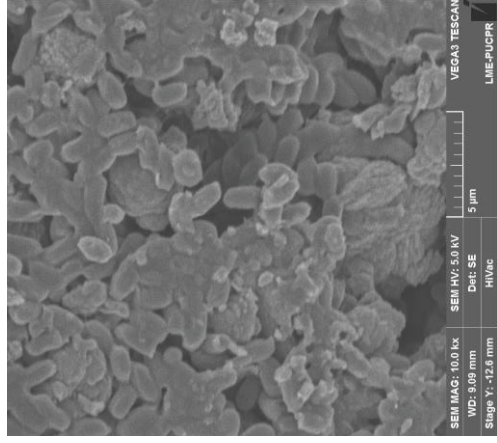
(A) Nitrato de Cálcio (5 kx)



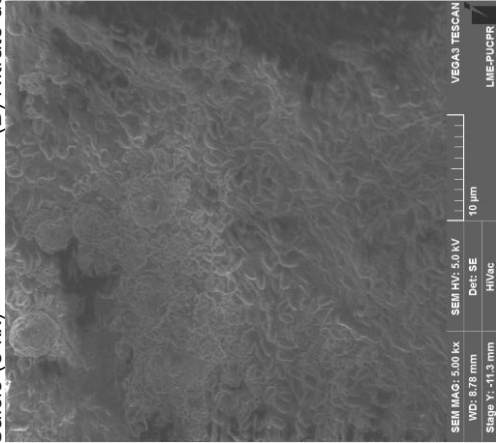
(B) Nitrato de Cálcio (10 kx)



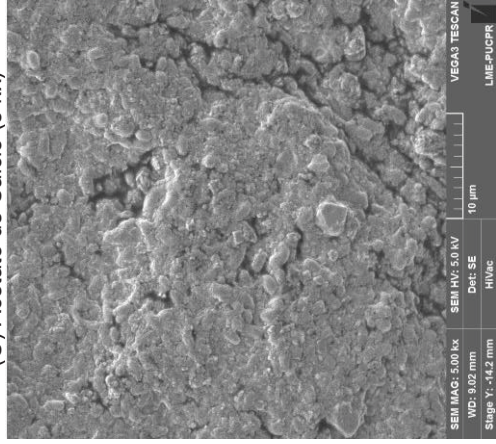
(C) Acetato de Cálcio (5 kx)



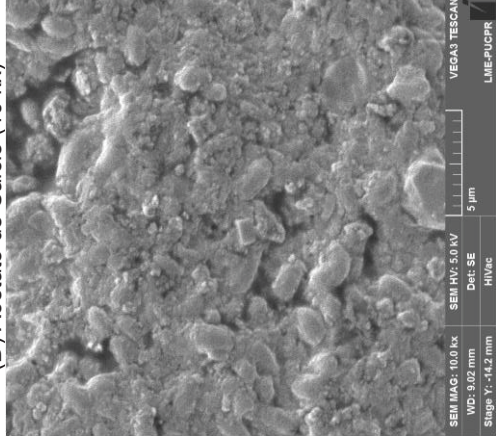
(D) Acetato de Cálcio (10 kx)



(E) Lactato de Cálcio (5 kx)



(G) Cloreto de Cálcio (5 kx)



(H) Cloreto de Cálcio (10 kx)

### B.3. Microrganismo marinho M-23

Figura 82 - Leituras Espectrofotômetro (M-23)

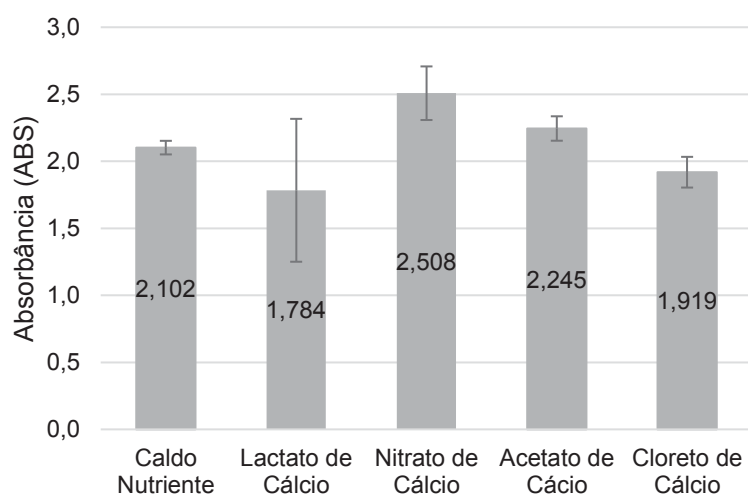


Figura 83 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo marinho denominado M-23 na presença de Nitrato de Cálcio (N23), Lactato de Cálcio (L23) e Cloreto de Cálcio (C23)

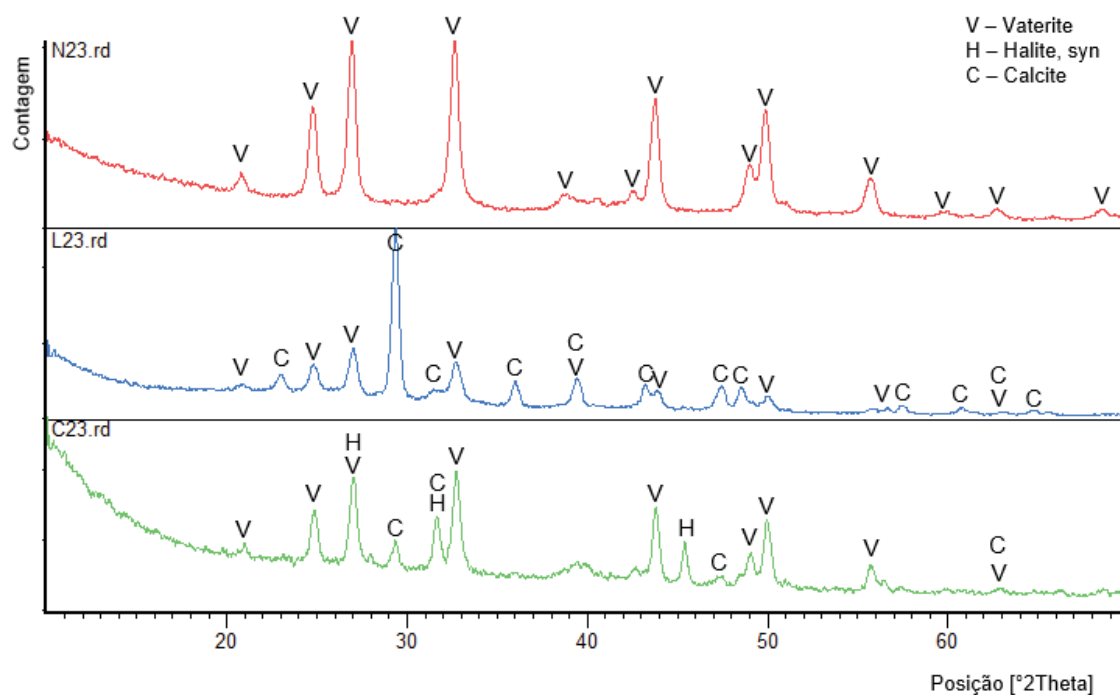
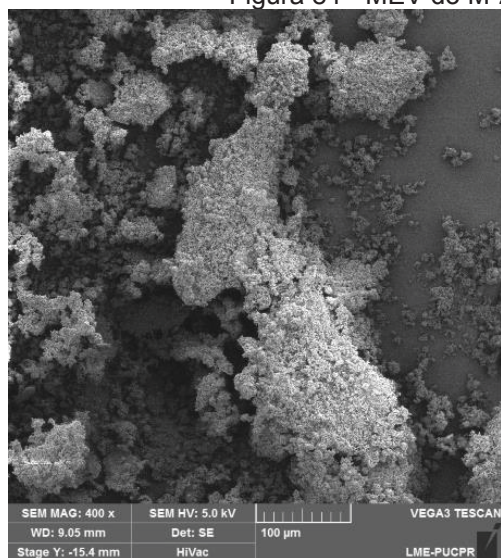


Tabela 29 - Compostos identificados do precipitado do microrganismo marinho M-23

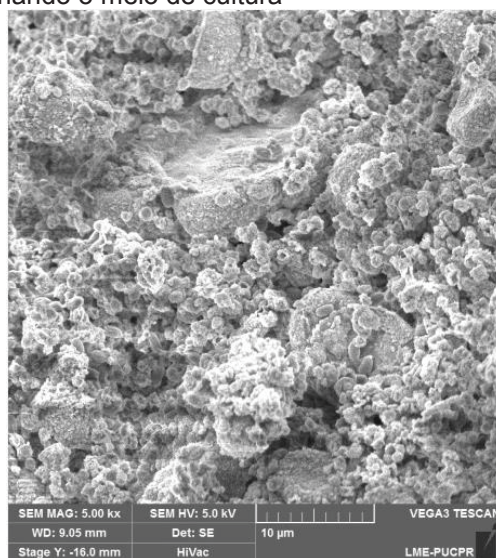
| Código de Referência | Nome do Composto    | Fórmula Química   | Mineral     |
|----------------------|---------------------|-------------------|-------------|
| 33-0268              | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Vaterita    |
| 05-0628              | Cloreto de Sódio    | NaCl              | Halita, syn |
| 47-1743              | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Calcita     |



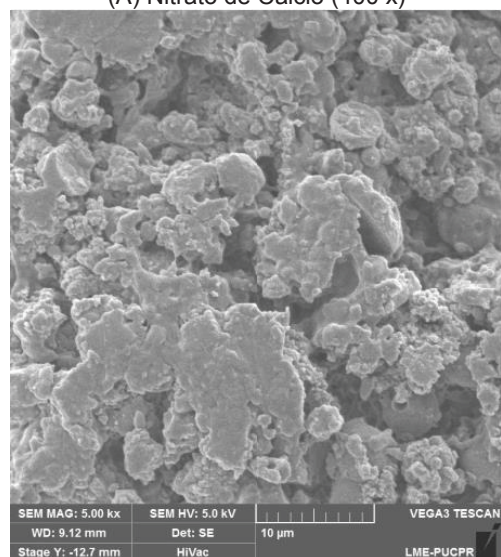
Figura 84 - MEV do M-23 variando o meio de cultura



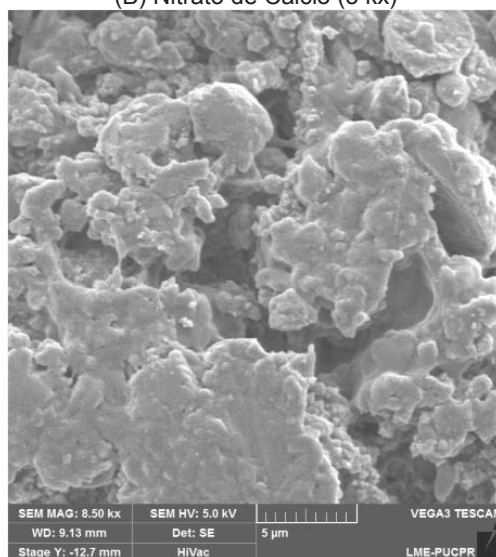
(A) Nitrato de Cálcio (400 x)



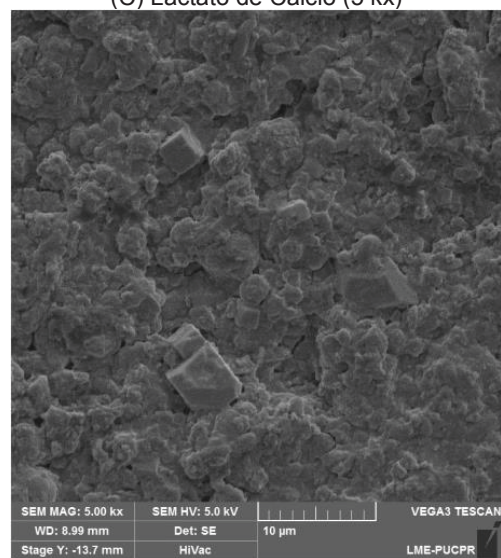
(B) Nitrato de Cálcio (5 kx)



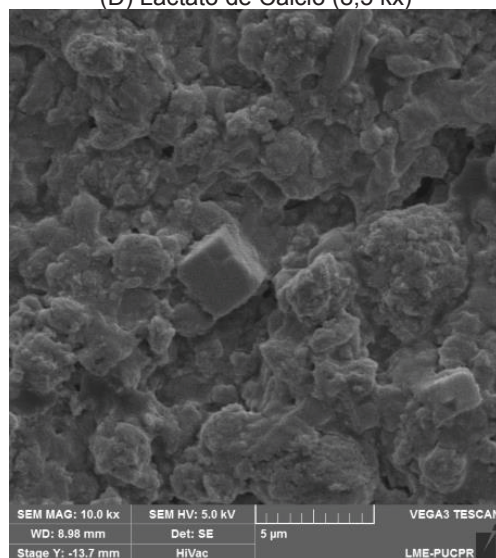
(C) Lactato de Cálcio (5 kx)



(D) Lactato de Cálcio (8,5 kx)



(E) Cloreto de Cálcio (5 kx)



(F) Cloreto de Cálcio (10 kx)

#### B.4. Microrganismo marinho M-31

Figura 85 - Leitura Espectrofotômetro (M-31)

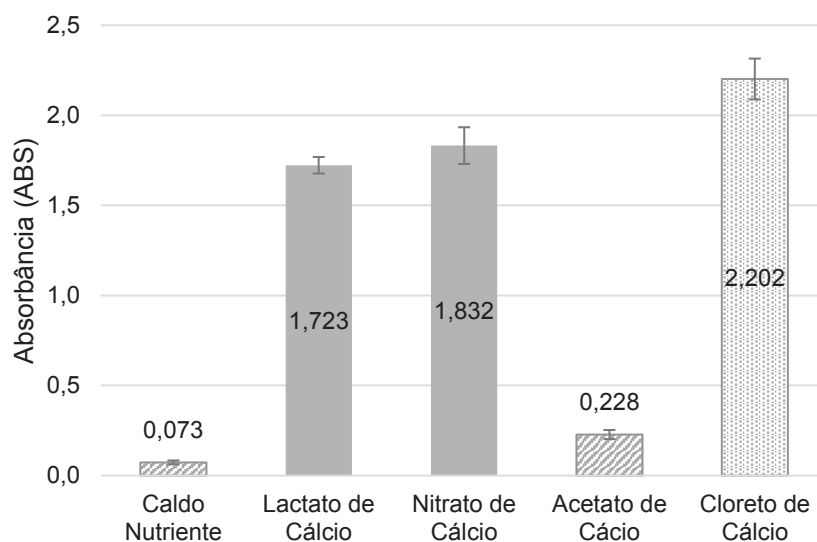


Figura 86 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo marinho denominado M-31 na presença de Nitrato de Cálcio (N31)

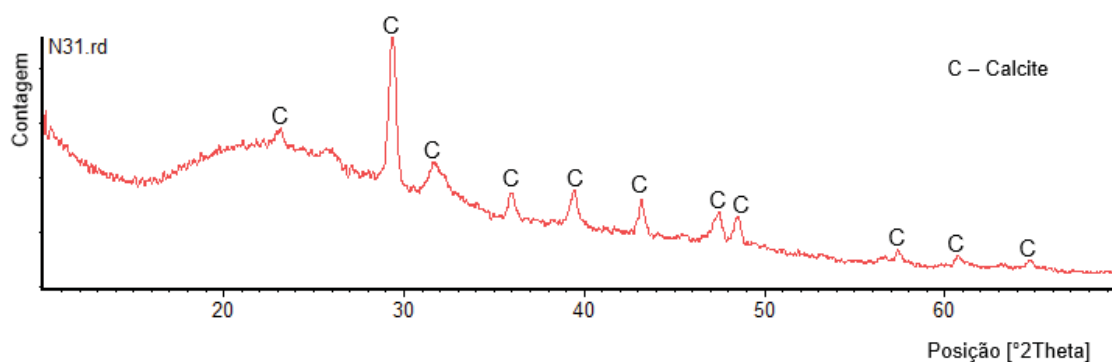
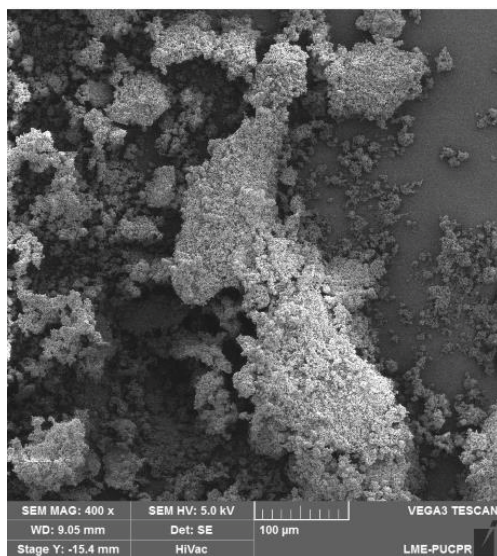


Tabela 30 - Compostos identificados do precipitado do microrganismo marinho M-31

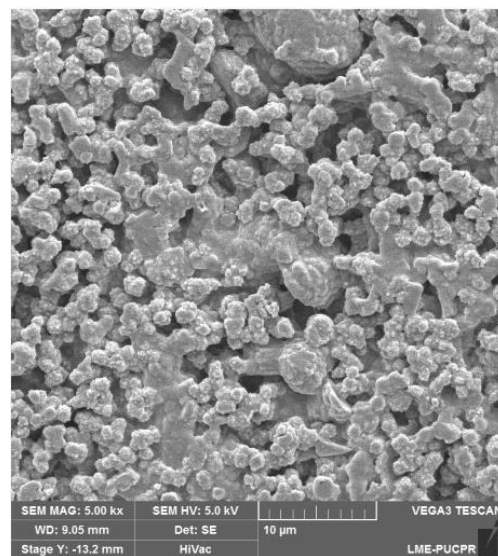
| Código de Referência | Nome do Composto    | Fórmula Química   | Mineral |
|----------------------|---------------------|-------------------|---------|
| 47-1743              | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Calcita |



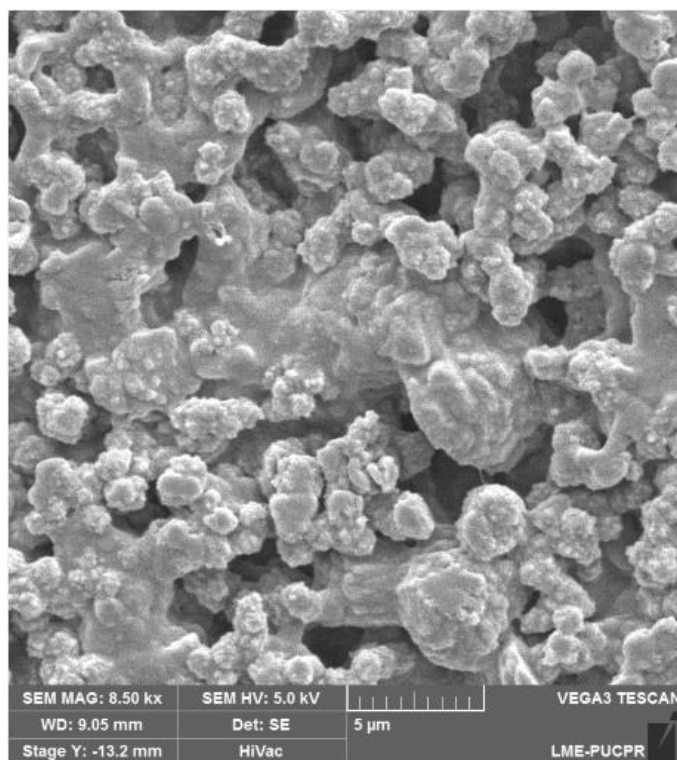
Figura 87 - MEV do M-31 variando o meio de cultura



(A) Nitrato de Cálcio (400 x)



(B) Nitrato de Cálcio (5 kx)



(C) Nitrato de Cálcio (8,5 kx)

### B.5. Microrganismo marinho M-432

Figura 88 - Leitura Espectrofotômetro (M-432)

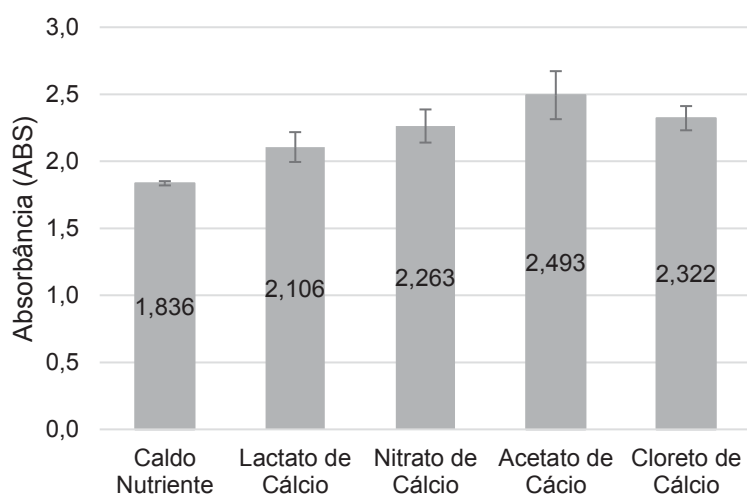


Figura 89 - Difração de Raio-X do precipitado do microrganismo marinho denominado M-432 na presença de Nitrato de Cálcio (N432), Acetato de Cálcio (A432), Lactato de Cálcio (L432) e Cloreto de Cálcio (C432)

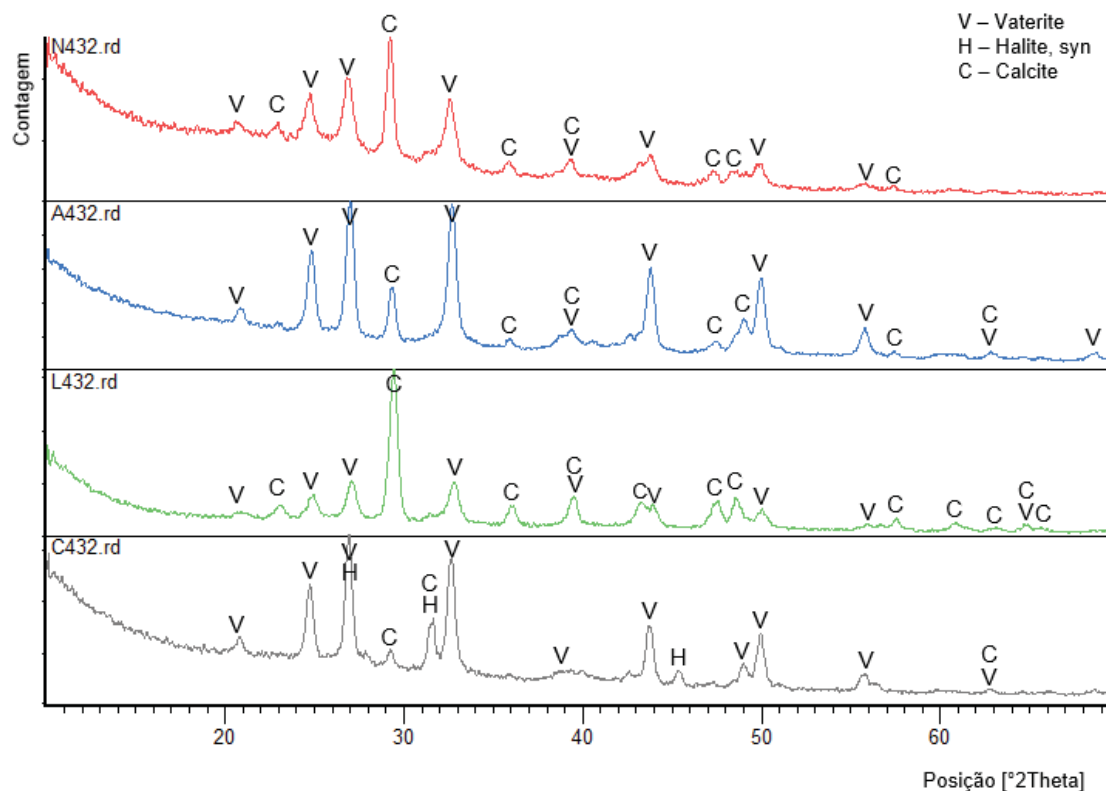
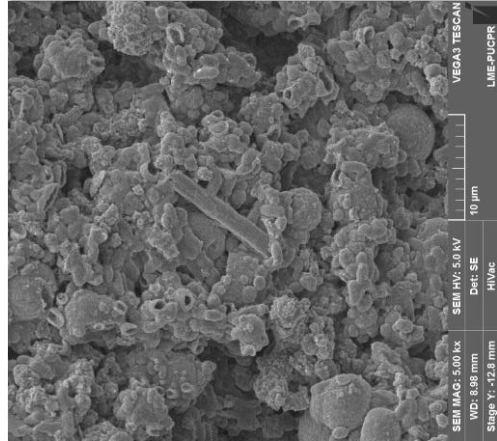


Tabela 31 - Compostos identificados do precipitado do microrganismo marinho M-432

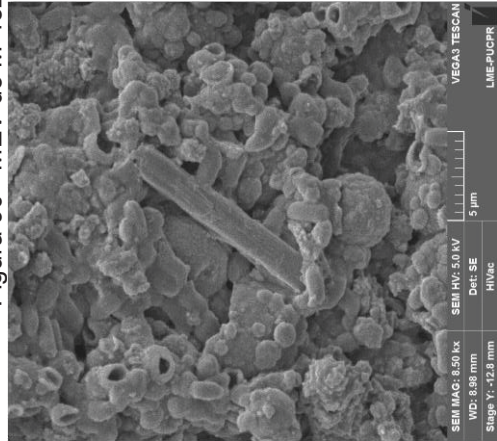
| Código de Referência | Nome do Composto    | Fórmula Química   | Mineral     |
|----------------------|---------------------|-------------------|-------------|
| 33-0268              | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Vaterita    |
| 05-0628              | Cloreto de Sódio    | NaCl              | Halita, syn |
| 47-1743              | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Calcita     |



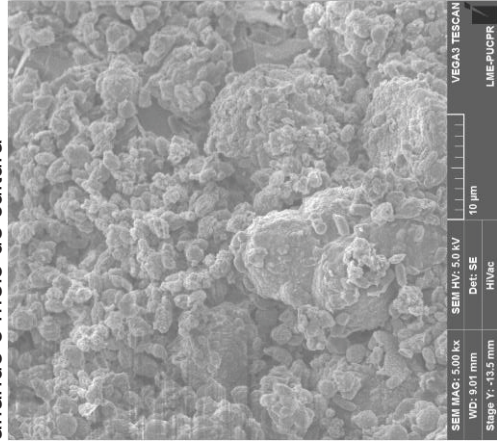
Figura 90 - MEV do M-432 variando o meio de cultura



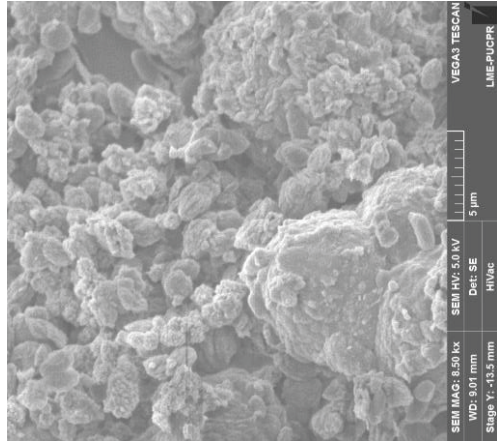
(A) Nitrato de Cálcio (5 kx)



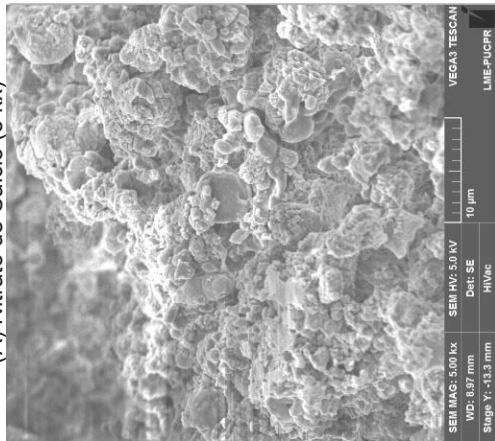
(B) Nitrato de Cálcio (8,5 kx)



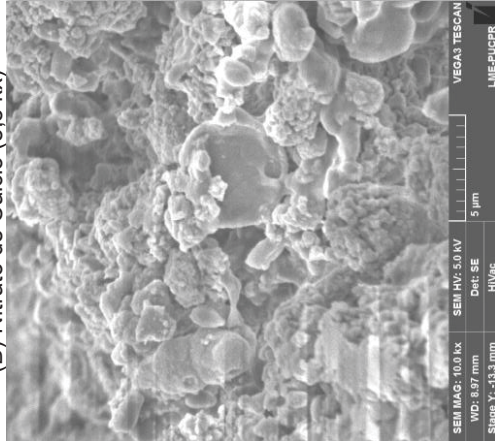
(C) Acetato de Cálcio (5 kx)



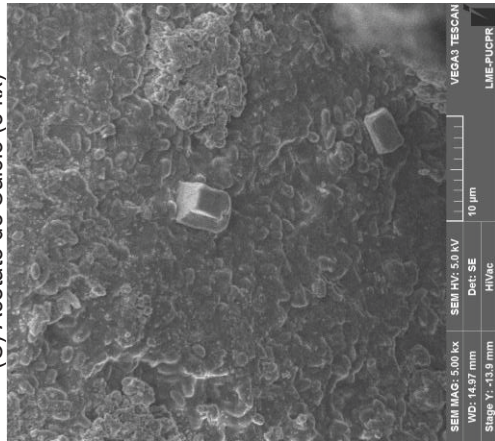
(D) Acetato de Cálcio (8,5 kx)



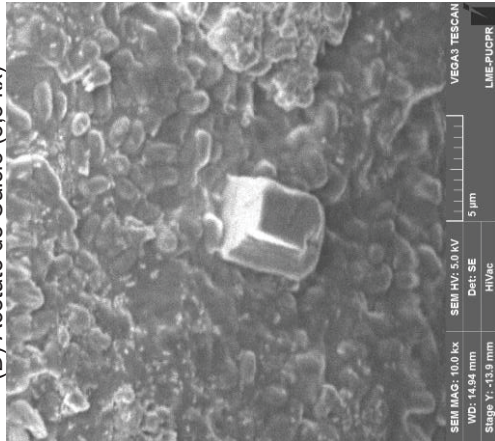
(E) Lactato de Cálcio (5 kx)



(F) Lactato de Cálcio (10 kx)



(G) Cloreto de Cálcio (5 kx)



(H) Cloreto de Cálcio (10 kx)

C. *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*

Figura 91 - Leitura Espectrofotômetro (B-SC)

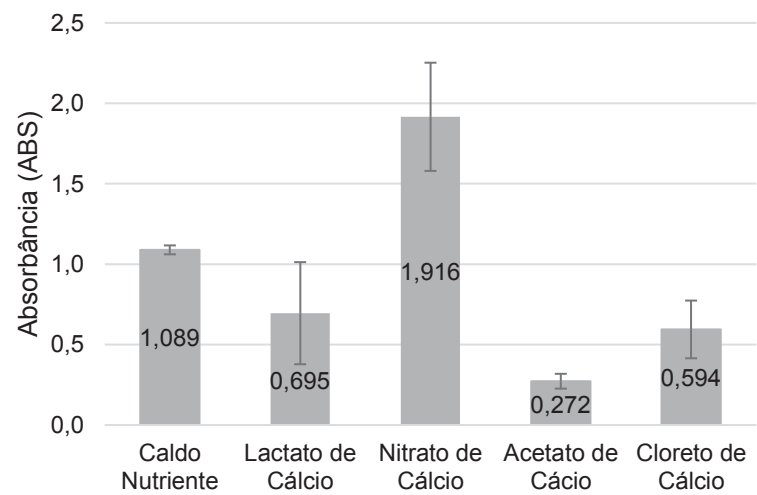


Figura 92 - *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus* na presença de Nitrato de Cálcio (NCS), Lactato de Cálcio (LSC) e Cloreto de Cálcio (CSC)

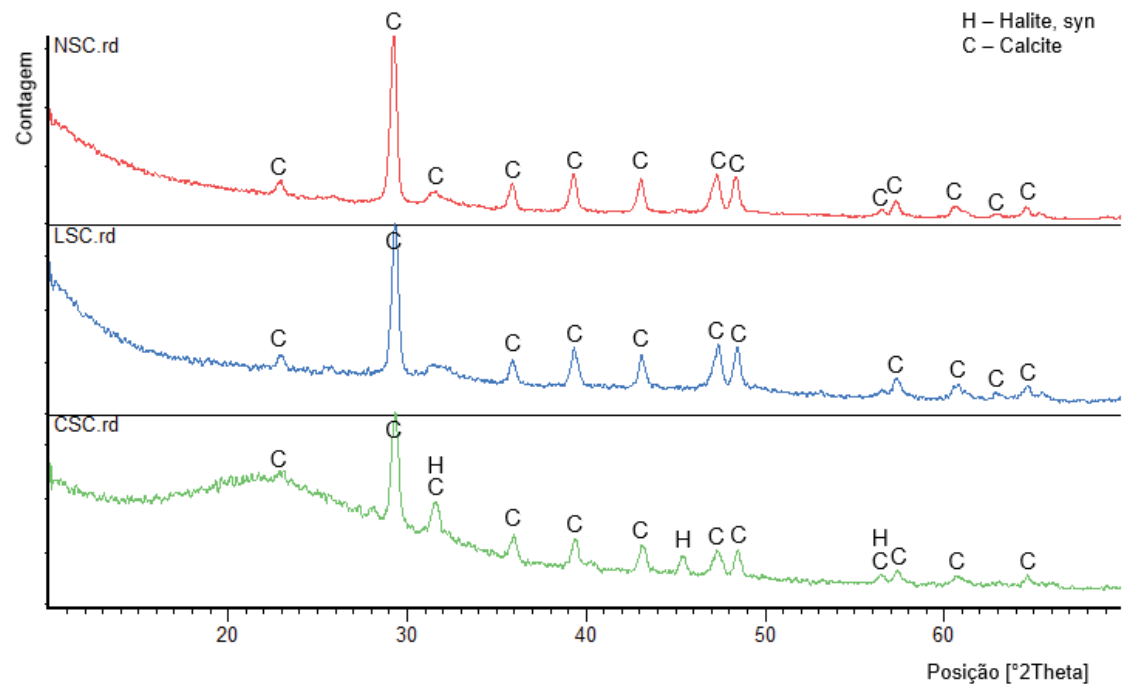
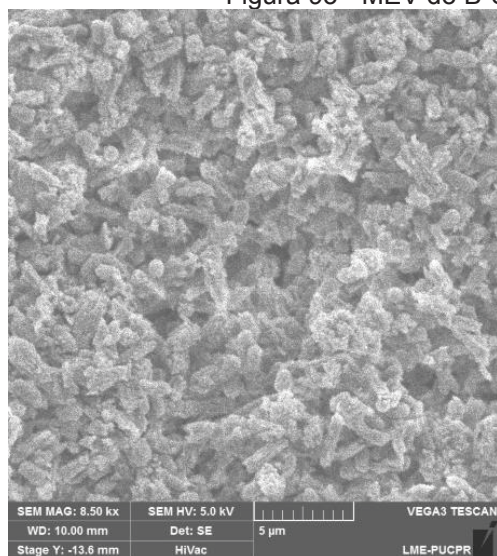


Tabela 32 - Compostos identificados dos precipitados dos microrganismos *Bacillus subtilis* e *Bacillus cereus*

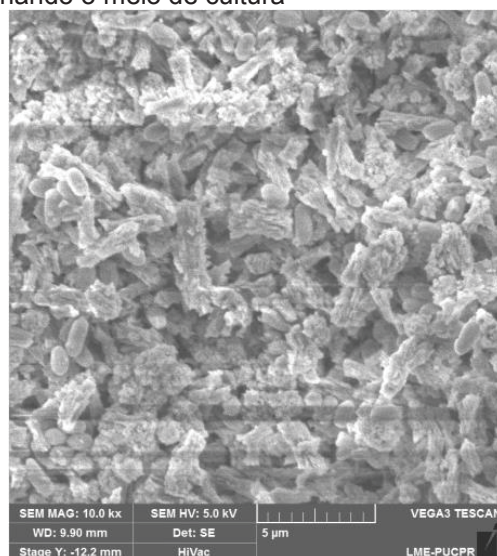
| Código de Referência | Nome do Composto    | Fórmula Química   | Mineral     |
|----------------------|---------------------|-------------------|-------------|
| 05-0628              | Cloreto de Sódio    | NaCl              | Halita, syn |
| 47-1743              | Carbonato de Cálcio | CaCO <sub>3</sub> | Calcita     |



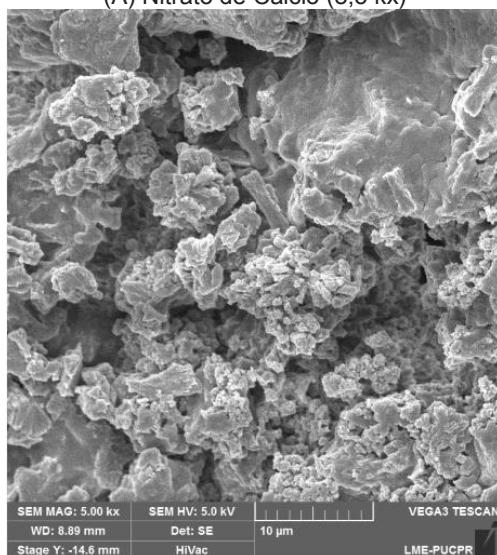
Figura 93 - MEV do B-SC variando o meio de cultura



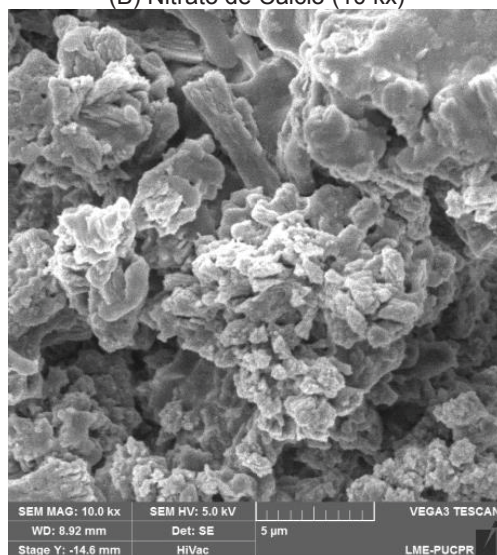
(A) Nitrato de Cálcio (8,5 kx)



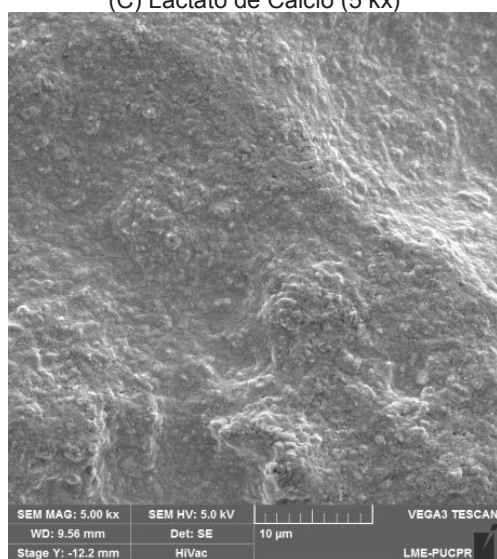
(B) Nitrato de Cálcio (10 kx)



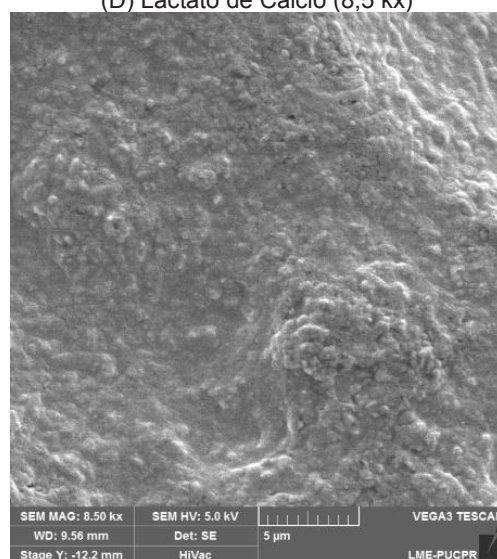
(C) Lactato de Cálcio (5 kx)



(D) Lactato de Cálcio (8,5 kx)



(E) Cloreto de Cálcio (5 kx)



(F) Cloreto de Cálcio (8,5 kx)

## APÊNDICE VII - LEITURAS (ABSORBÂNCIA POR ESPECTROFOTÔMETRO) E ESTATÍSTICA DO CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS QUANDO SUBMETIDOS A DIFERENTES PH'S

Tabela 33 - Leituras de absorbância (ABS) das amostras em meio de cultura com pH 7

| Amostra | pH = 7 |       |       |
|---------|--------|-------|-------|
| B-414   | 0,155  | 0,602 | 0,387 |
| B-422   | 1,079  | 1,108 | 1,594 |
| B-423   | 0,842  | 0,499 | 0,306 |
| B-424   | 0,315  | 0,392 | 0,297 |
| M-12    | 0,673  | 0,725 | 0,394 |
| M-21    | 0,87   | 0,892 | 0,88  |
| M-23    | 0,394  | 0,522 | 0,691 |
| M-31    | 0,455  | 0,955 | 1,029 |
| M-432   | 0,878  | 0,443 | 0,914 |
| B-SC    | 0,897  | 0,996 | 0,939 |

Tabela 34 - Leituras de absorbância (ABS) das amostras em meio de cultura com pH 9

| Amostra | pH = 9 |        |        |
|---------|--------|--------|--------|
| B-414   | 0,095  | 0,378  | 0,062  |
| B-422   | 0,314  | 0,284  | 0,320  |
| B-423   | 0,057  | 0,291  | 0,014  |
| B-424   | 0,161  | 0,296  | 0,267  |
| M-12    | 0,071  | 0,141  | 0,149  |
| M-21    | -0,318 | -0,322 | -0,159 |
| M-23    | 0,152  | 0,132  | 0,153  |
| M-31    | 0,230  | 0,118  | 0,128  |
| M-432   | 0,146  | 0,118  | 0,128  |
| B-SC    | 0,146  | 0,255  | 0,219  |

Tabela 35 - Leituras de absorbância (ABS) das amostras em meio de cultura com pH 10

| Amostra | pH = 10 |       |       |
|---------|---------|-------|-------|
| B-414   | 0,166   | 0,150 | 0,153 |
| B-422   | 0,482   | 0,510 | 0,354 |
| B-423   | 0,500   | 0,473 | 0,491 |
| B-424   | 0,286   | 0,407 | 0,365 |
| M-12    | 0,429   | 0,419 | 0,450 |
| M-21    | 0,429   | 0,405 | 0,430 |
| M-23    | 0,341   | 0,098 | 0,380 |
| M-31    | 0,197   | 0,403 | 0,399 |
| M-432   | 0,078   | 0,093 | 0,082 |
| B-SC    | 0,248   | 0,245 | 0,246 |

Tabela 36 - Leituras de absorvância (ABS) das amostras em meio de cultura com pH 11

| Amostra | pH = 11 |       |        |
|---------|---------|-------|--------|
| B-414   | 0,287   | 0,288 | 0,310  |
| B-422   | 0,354   | 0,377 | 0,348  |
| B-423   | 0,332   | 0,381 | 0,260  |
| B-424   | 0,219   | 0,264 | 0,239  |
| M-12    | 0,159   | 0,287 | 0,326  |
| M-21    | 0,001   | 0,003 | -0,004 |
| M-23    | 0,327   | 0,328 | 0,311  |
| M-31    | 0,240   | 0,212 | 0,276  |
| M-432   | 0,228   | 0,154 | 0,257  |
| B-SC    | 0,313   | 0,315 | 0,321  |

Tabela 37 - Leituras de absorvância (ABS) das amostras em meio de cultura com pH 12

| Amostra | pH = 12 |       |        |
|---------|---------|-------|--------|
| B-414   | 0,123   | 0,148 | 0,151  |
| B-422   | 0,215   | 0,214 | 0,253  |
| B-423   | 0,170   | 0,209 | 0,213  |
| B-424   | 0,193   | 0,200 | 0,170  |
| M-12    | 0,298   | 0,327 | 0,296  |
| M-21    | 0,162   | 0,169 | 0,187  |
| M-23    | 0,091   | 0,100 | 0,058  |
| M-31    | 0,034   | 0,047 | 0,045  |
| M-432   | 0,018   | 0,019 | -0,045 |
| B-SC    | 0,261   | 0,246 | 0,282  |

Tabela 38 - Anova de duas vias (Two Way Anova) entre microrganismo e pH

| Fonte de Variação  | Graus de liberdade | Soma dos quadrados | Média quadrática | Teste F | Valor p |
|--------------------|--------------------|--------------------|------------------|---------|---------|
| Microrganismo      | 9                  | 1,091              | 0,121            | 10,494  | <0,001  |
| pH                 | 4                  | 6,329              | 1,582            | 137,042 | <0,001  |
| Microrganismo x pH | 36                 | 2,699              | 0,075            | 6,493   | <0,001  |
| Resíduo            | 100                | 1,155              | 0,0115           |         |         |
| Total              | 149                | 11,273             | 0,0757           |         |         |

Tabela 39 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo B-414

| Comparação     | Diferença entre médias | p | q     | P     | Limite de decisão P<0,05 |
|----------------|------------------------|---|-------|-------|--------------------------|
| ph 7 vs. ph 12 | 0,241                  | 5 | 3,879 | 0,055 | No                       |
| ph 7 vs. ph 10 | 0,225                  | 5 | 3,627 | 0,085 | Do Not Test              |

|                 |        |   |       |       |             |
|-----------------|--------|---|-------|-------|-------------|
| ph 7 vs. ph 9   | 0,203  | 5 | 3,272 | 0,149 | Do Not Test |
| ph 7 vs. ph 11  | 0,0863 | 5 | 1,392 | 0,862 | Do Not Test |
| ph 11 vs. ph 12 | 0,154  | 5 | 2,488 | 0,403 | Do Not Test |
| ph 11 vs. ph 10 | 0,139  | 5 | 2,235 | 0,513 | Do Not Test |
| ph 11 vs. ph 9  | 0,117  | 5 | 1,881 | 0,673 | Do Not Test |
| ph 9 vs. ph 12  | 0,0377 | 5 | 0,607 | 0,993 | Do Not Test |
| ph 9 vs. ph 10  | 0,022  | 5 | 0,355 | 0,999 | Do Not Test |
| ph 10 vs. ph 12 | 0,0157 | 5 | 0,253 | 1     | Do Not Test |

Tabela 40 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo B-422

| Comparação      | Diferença entre médias | p | q      | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|---|--------|--------|--------------------------|
| ph 7 vs. ph 12  | 1,033                  | 5 | 16,651 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 9   | 0,954                  | 5 | 15,383 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 11  | 0,901                  | 5 | 14,518 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 10  | 0,812                  | 5 | 13,083 | <0,001 | Yes                      |
| ph 10 vs. ph 12 | 0,221                  | 5 | 3,568  | 0,094  | No                       |
| ph 10 vs. ph 9  | 0,143                  | 5 | 2,3    | 0,485  | Do Not Test              |
| ph 10 vs. ph 11 | 0,089                  | 5 | 1,435  | 0,848  | Do Not Test              |
| ph 11 vs. ph 12 | 0,132                  | 5 | 2,133  | 0,56   | Do Not Test              |
| ph 11 vs. ph 9  | 0,0537                 | 5 | 0,865  | 0,973  | Do Not Test              |
| ph 9 vs. ph 12  | 0,0787                 | 5 | 1,268  | 0,898  | Do Not Test              |

Tabela 41 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo B-423

| Comparação      | Diferença entre médias | p | q     | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|---|-------|--------|--------------------------|
| ph 7 vs. ph 9   | 0,428                  | 5 | 6,904 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 12  | 0,352                  | 5 | 5,669 | 0,001  | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 11  | 0,225                  | 5 | 3,621 | 0,086  | No                       |
| ph 7 vs. ph 10  | 0,061                  | 5 | 0,983 | 0,957  | Do Not Test              |
| ph 10 vs. ph 9  | 0,367                  | 5 | 5,921 | <0,001 | Yes                      |
| ph 10 vs. ph 12 | 0,291                  | 5 | 4,685 | 0,011  | Yes                      |
| ph 10 vs. ph 11 | 0,164                  | 5 | 2,638 | 0,343  | Do Not Test              |
| ph 11 vs. ph 9  | 0,204                  | 5 | 3,283 | 0,147  | No                       |
| ph 11 vs. ph 12 | 0,127                  | 5 | 2,047 | 0,599  | Do Not Test              |
| ph 12 vs. ph 9  | 0,0767                 | 5 | 1,236 | 0,906  | Do Not Test              |



Tabela 42 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo B-424

| Comparação      | Diferença entre médias | p | q      | P     | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|---|--------|-------|--------------------------|
| ph 10 vs. ph 12 | 0,165                  | 5 | 2,66   | 0,335 | No                       |
| ph 10 vs. ph 11 | 0,112                  | 5 | 1,805  | 0,706 | Do Not Test              |
| ph 10 vs. ph 9  | 0,111                  | 5 | 1,795  | 0,711 | Do Not Test              |
| ph 10 vs. ph 7  | 0,018                  | 5 | 0,29   | 1     | Do Not Test              |
| ph 7 vs. ph 12  | 0,147                  | 5 | 2,369  | 0,454 | Do Not Test              |
| ph 7 vs. ph 11  | 0,094                  | 5 | 1,515  | 0,821 | Do Not Test              |
| ph 7 vs. ph 9   | 0,0933                 | 5 | 1,504  | 0,825 | Do Not Test              |
| ph 9 vs. ph 12  | 0,0537                 | 5 | 0,865  | 0,973 | Do Not Test              |
| ph 9 vs. ph 11  | 0,000667               | 5 | 0,0107 | 1     | Do Not Test              |
| ph 11 vs. ph 12 | 0,053                  | 5 | 0,854  | 0,974 | Do Not Test              |

Tabela 43 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo M-12

| Comparação      | Diferença entre médias | p | q     | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|---|-------|--------|--------------------------|
| ph 7 vs. ph 9   | 0,477                  | 5 | 7,689 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 11  | 0,34                   | 5 | 5,48  | 0,002  | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 12  | 0,29                   | 5 | 4,68  | 0,011  | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 10  | 0,165                  | 5 | 2,654 | 0,337  | No                       |
| ph 10 vs. ph 9  | 0,312                  | 5 | 5,035 | 0,005  | Yes                      |
| ph 10 vs. ph 11 | 0,175                  | 5 | 2,826 | 0,274  | No                       |
| ph 10 vs. ph 12 | 0,126                  | 5 | 2,026 | 0,608  | Do Not Test              |
| ph 12 vs. ph 9  | 0,187                  | 5 | 3,009 | 0,217  | No                       |
| ph 12 vs. ph 11 | 0,0497                 | 5 | 0,801 | 0,98   | Do Not Test              |
| ph 11 vs. ph 9  | 0,137                  | 5 | 2,208 | 0,526  | Do Not Test              |

Tabela 44 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo M-21

| Comparação      | Diferença entre médias | p | q      | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|---|--------|--------|--------------------------|
| ph 7 vs. ph 9   | 1,147                  | 5 | 18,489 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 11  | 0,881                  | 5 | 14,195 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 12  | 0,708                  | 5 | 11,412 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 10  | 0,459                  | 5 | 7,404  | <0,001 | Yes                      |
| ph 10 vs. ph 9  | 0,688                  | 5 | 11,085 | <0,001 | Yes                      |
| ph 10 vs. ph 11 | 0,421                  | 5 | 6,791  | <0,001 | Yes                      |
| ph 10 vs. ph 12 | 0,249                  | 5 | 4,008  | 0,043  | Yes                      |
| ph 12 vs. ph 9  | 0,439                  | 5 | 7,076  | <0,001 | Yes                      |
| ph 12 vs. ph 11 | 0,173                  | 5 | 2,783  | 0,289  | No                       |
| ph 11 vs. ph 9  | 0,266                  | 5 | 4,293  | 0,025  | Yes                      |

Tabela 45 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo M-23

| Comparação      | Diferença entre médias | p | q     | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|---|-------|--------|--------------------------|
| ph 7 vs. ph 12  | 0,453                  | 5 | 7,297 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 9   | 0,39                   | 5 | 6,286 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 10  | 0,263                  | 5 | 4,234 | 0,028  | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 11  | 0,214                  | 5 | 3,444 | 0,115  | No                       |
| ph 11 vs. ph 12 | 0,239                  | 5 | 3,852 | 0,058  | No                       |
| ph 11 vs. ph 9  | 0,176                  | 5 | 2,842 | 0,269  | Do Not Test              |
| ph 11 vs. ph 10 | 0,049                  | 5 | 0,79  | 0,981  | Do Not Test              |
| ph 10 vs. ph 12 | 0,19                   | 5 | 3,063 | 0,201  | Do Not Test              |
| ph 10 vs. ph 9  | 0,127                  | 5 | 2,052 | 0,596  | Do Not Test              |
| ph 9 vs. ph 12  | 0,0627                 | 5 | 1,01  | 0,953  | Do Not Test              |

Tabela 46 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo M-31

| Comparação      | Diferença entre médias | p | q      | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|---|--------|--------|--------------------------|
| ph 7 vs. ph 12  | 0,771                  | 5 | 12,428 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 9   | 0,654                  | 5 | 10,547 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 11  | 0,57                   | 5 | 9,193  | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 10  | 0,48                   | 5 | 7,737  | <0,001 | Yes                      |
| ph 10 vs. ph 12 | 0,291                  | 5 | 4,691  | 0,011  | Yes                      |
| ph 10 vs. ph 9  | 0,174                  | 5 | 2,81   | 0,28   | No                       |
| ph 10 vs. ph 11 | 0,0903                 | 5 | 1,456  | 0,841  | Do Not Test              |
| ph 11 vs. ph 12 | 0,201                  | 5 | 3,235  | 0,158  | No                       |
| ph 11 vs. ph 9  | 0,084                  | 5 | 1,354  | 0,873  | Do Not Test              |
| ph 9 vs. ph 12  | 0,117                  | 5 | 1,881  | 0,673  | Do Not Test              |

Tabela 47 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo M-432

| Comparação      | Diferença entre médias | p | q      | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|---|--------|--------|--------------------------|
| ph 7 vs. ph 12  | 0,748                  | 5 | 12,052 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 10  | 0,661                  | 5 | 10,649 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 9   | 0,614                  | 5 | 9,902  | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 11  | 0,532                  | 5 | 8,575  | <0,001 | Yes                      |
| ph 11 vs. ph 12 | 0,216                  | 5 | 3,476  | 0,109  | No                       |
| ph 11 vs. ph 10 | 0,129                  | 5 | 2,074  | 0,587  | Do Not Test              |
| ph 11 vs. ph 9  | 0,0823                 | 5 | 1,327  | 0,881  | Do Not Test              |
| ph 9 vs. ph 12  | 0,133                  | 5 | 2,149  | 0,552  | Do Not Test              |
| ph 9 vs. ph 10  | 0,0463                 | 5 | 0,747  | 0,984  | Do Not Test              |
| ph 10 vs. ph 12 | 0,087                  | 5 | 1,402  | 0,859  | Do Not Test              |

Tabela 48 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação do pH com o microrganismo B-SC

| Comparação      | Diferença entre médias | p | q      | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|---|--------|--------|--------------------------|
| ph 7 vs. ph 9   | 0,737                  | 5 | 11,885 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 10  | 0,698                  | 5 | 11,246 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 12  | 0,681                  | 5 | 10,977 | <0,001 | Yes                      |
| ph 7 vs. ph 11  | 0,628                  | 5 | 10,117 | <0,001 | Yes                      |
| ph 11 vs. ph 9  | 0,11                   | 5 | 1,768  | 0,722  | No                       |
| ph 11 vs. ph 10 | 0,07                   | 5 | 1,128  | 0,931  | Do Not Test              |
| ph 11 vs. ph 12 | 0,0533                 | 5 | 0,86   | 0,974  | Do Not Test              |
| ph 12 vs. ph 9  | 0,0563                 | 5 | 0,908  | 0,968  | Do Not Test              |
| ph 12 vs. ph 10 | 0,0167                 | 5 | 0,269  | 1      | Do Not Test              |
| ph 10 vs. ph 9  | 0,0397                 | 5 | 0,639  | 0,991  | Do Not Test              |

Tabela 49 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação os microrganismos e o pH 7

| Comparação      | Diferença entre médias | p  | q      | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|----|--------|--------|--------------------------|
| B-422 vs. B-424 | 0,926                  | 10 | 14,921 | <0,001 | Yes                      |
| B-422 vs. B-414 | 0,879                  | 10 | 14,169 | <0,001 | Yes                      |
| B-422 vs. M-23  | 0,725                  | 10 | 11,681 | <0,001 | Yes                      |
| B-422 vs. B-423 | 0,711                  | 10 | 11,466 | <0,001 | Yes                      |
| B-422 vs. M-12  | 0,663                  | 10 | 10,687 | <0,001 | Yes                      |
| B-422 vs. M-432 | 0,515                  | 10 | 8,307  | <0,001 | Yes                      |
| B-422 vs. M-31  | 0,447                  | 10 | 7,211  | <0,001 | Yes                      |
| B-422 vs. M-21  | 0,38                   | 10 | 6,12   | 0,002  | Yes                      |
| B-422 vs. B-SC  | 0,316                  | 10 | 5,099  | 0,017  | Yes                      |
| B-SC vs. B-424  | 0,609                  | 10 | 9,822  | <0,001 | Yes                      |
| B-SC vs. B-414  | 0,563                  | 10 | 9,07   | <0,001 | Yes                      |
| B-SC vs. M-23   | 0,408                  | 10 | 6,582  | <0,001 | Yes                      |
| B-SC vs. B-423  | 0,395                  | 10 | 6,367  | <0,001 | Yes                      |
| B-SC vs. M-12   | 0,347                  | 10 | 5,588  | 0,005  | Yes                      |
| B-SC vs. M-432  | 0,199                  | 10 | 3,208  | 0,419  | No                       |
| B-SC vs. M-31   | 0,131                  | 10 | 2,112  | 0,892  | Do Not Test              |
| B-SC vs. M-21   | 0,0633                 | 10 | 1,021  | 0,999  | Do Not Test              |
| M-21 vs. B-424  | 0,546                  | 10 | 8,801  | <0,001 | Yes                      |
| M-21 vs. B-414  | 0,499                  | 10 | 8,049  | <0,001 | Yes                      |
| M-21 vs. M-23   | 0,345                  | 10 | 5,561  | 0,006  | Yes                      |
| M-21 vs. B-423  | 0,332                  | 10 | 5,346  | 0,01   | Yes                      |
| M-21 vs. M-12   | 0,283                  | 10 | 4,567  | 0,051  | No                       |
| M-21 vs. M-432  | 0,136                  | 10 | 2,187  | 0,87   | Do Not Test              |

|                 |        |    |       |        |             |
|-----------------|--------|----|-------|--------|-------------|
| M-21 vs. M-31   | 0,0677 | 10 | 1,091 | 0,999  | Do Not Test |
| M-31 vs. B-424  | 0,478  | 10 | 7,71  | <0,001 | Yes         |
| M-31 vs. B-414  | 0,432  | 10 | 6,958 | <0,001 | Yes         |
| M-31 vs. M-23   | 0,277  | 10 | 4,47  | 0,061  | No          |
| M-31 vs. B-423  | 0,264  | 10 | 4,255 | 0,091  | Do Not Test |
| M-31 vs. M-12   | 0,216  | 10 | 3,476 | 0,304  | Do Not Test |
| M-31 vs. M-432  | 0,068  | 10 | 1,096 | 0,999  | Do Not Test |
| M-432 vs. B-424 | 0,41   | 10 | 6,614 | <0,001 | Yes         |
| M-432 vs. B-414 | 0,364  | 10 | 5,862 | 0,003  | Yes         |
| M-432 vs. M-23  | 0,209  | 10 | 3,374 | 0,346  | Do Not Test |
| M-432 vs. B-423 | 0,196  | 10 | 3,159 | 0,441  | Do Not Test |
| M-432 vs. M-12  | 0,148  | 10 | 2,38  | 0,802  | Do Not Test |
| M-12 vs. B-424  | 0,263  | 10 | 4,234 | 0,095  | No          |
| M-12 vs. B-414  | 0,216  | 10 | 3,482 | 0,302  | Do Not Test |
| M-12 vs. M-23   | 0,0617 | 10 | 0,994 | 0,999  | Do Not Test |
| M-12 vs. B-423  | 0,0483 | 10 | 0,779 | 1      | Do Not Test |
| B-423 vs. B-424 | 0,214  | 10 | 3,455 | 0,313  | Do Not Test |
| B-423 vs. B-414 | 0,168  | 10 | 2,703 | 0,662  | Do Not Test |
| B-423 vs. M-23  | 0,0133 | 10 | 0,215 | 1      | Do Not Test |
| M-23 vs. B-424  | 0,201  | 10 | 3,24  | 0,404  | Do Not Test |
| M-23 vs. B-414  | 0,154  | 10 | 2,488 | 0,759  | Do Not Test |
| B-414 vs. B-424 | 0,0467 | 10 | 0,752 | 1      | Do Not Test |

Tabela 50 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação os microrganismos e o pH 9

| <b>Comparação</b> | <b>Diferença entre médias</b> | <b>p</b> | <b>q</b> | <b>P</b> | <b>Limite de decisão<br/>P&lt;0,05</b> |
|-------------------|-------------------------------|----------|----------|----------|--|
| B-422 vs. M-21    | 0,572                         | 10       | 9,225    | <0,001   | Yes                                    |
| B-422 vs. M-12    | 0,186                         | 10       | 2,993    | 0,521    | No                                     |
| B-422 vs. B-423   | 0,185                         | 10       | 2,987    | 0,523    | Do Not Test                            |
| B-422 vs. M-432   | 0,175                         | 10       | 2,826    | 0,602    | Do Not Test                            |
| B-422 vs. M-23    | 0,16                          | 10       | 2,584    | 0,716    | Do Not Test                            |
| B-422 vs. M-31    | 0,147                         | 10       | 2,375    | 0,804    | Do Not Test                            |
| B-422 vs. B-414   | 0,128                         | 10       | 2,058    | 0,906    | Do Not Test                            |
| B-422 vs. B-SC    | 0,0993                        | 10       | 1,601    | 0,98     | Do Not Test                            |
| B-422 vs. B-424   | 0,0647                        | 10       | 1,042    | 0,999    | Do Not Test                            |
| B-424 vs. M-21    | 0,508                         | 10       | 8,183    | <0,001   | Yes                                    |
| B-424 vs. M-12    | 0,121                         | 10       | 1,95     | 0,931    | Do Not Test                            |
| B-424 vs. B-423   | 0,121                         | 10       | 1,945    | 0,932    | Do Not Test                            |
| B-424 vs. M-432   | 0,111                         | 10       | 1,784    | 0,96     | Do Not Test                            |
| B-424 vs. M-23    | 0,0957                        | 10       | 1,542    | 0,985    | Do Not Test                            |
| B-424 vs. M-31    | 0,0827                        | 10       | 1,333    | 0,995    | Do Not Test                            |

|                 |          |    |         |        |             |
|-----------------|----------|----|---------|--------|-------------|
| B-424 vs. B-414 | 0,063    | 10 | 1,015   | 0,999  | Do Not Test |
| B-424 vs. B-SC  | 0,0347   | 10 | 0,559   | 1      | Do Not Test |
| B-SC vs. M-21   | 0,473    | 10 | 7,624   | <0,001 | Yes         |
| B-SC vs. M-12   | 0,0863   | 10 | 1,392   | 0,993  | Do Not Test |
| B-SC vs. B-423  | 0,086    | 10 | 1,386   | 0,993  | Do Not Test |
| B-SC vs. M-432  | 0,076    | 10 | 1,225   | 0,997  | Do Not Test |
| B-SC vs. M-23   | 0,061    | 10 | 0,983   | 1      | Do Not Test |
| B-SC vs. M-31   | 0,048    | 10 | 0,774   | 1      | Do Not Test |
| B-SC vs. B-414  | 0,0283   | 10 | 0,457   | 1      | Do Not Test |
| B-414 vs. M-21  | 0,445    | 10 | 7,168   | <0,001 | Yes         |
| B-414 vs. M-12  | 0,058    | 10 | 0,935   | 1      | Do Not Test |
| B-414 vs. B-423 | 0,0577   | 10 | 0,93    | 1      | Do Not Test |
| B-414 vs. M-432 | 0,0477   | 10 | 0,768   | 1      | Do Not Test |
| B-414 vs. M-23  | 0,0327   | 10 | 0,527   | 1      | Do Not Test |
| B-414 vs. M-31  | 0,0197   | 10 | 0,317   | 1      | Do Not Test |
| M-31 vs. M-21   | 0,425    | 10 | 6,851   | <0,001 | Yes         |
| M-31 vs. M-12   | 0,0383   | 10 | 0,618   | 1      | Do Not Test |
| M-31 vs. B-423  | 0,038    | 10 | 0,613   | 1      | Do Not Test |
| M-31 vs. M-432  | 0,028    | 10 | 0,451   | 1      | Do Not Test |
| M-31 vs. M-23   | 0,013    | 10 | 0,21    | 1      | Do Not Test |
| M-23 vs. M-21   | 0,412    | 10 | 6,641   | <0,001 | Yes         |
| M-23 vs. M-12   | 0,0253   | 10 | 0,408   | 1      | Do Not Test |
| M-23 vs. B-423  | 0,025    | 10 | 0,403   | 1      | Do Not Test |
| M-23 vs. M-432  | 0,015    | 10 | 0,242   | 1      | Do Not Test |
| M-432 vs. M-21  | 0,397    | 10 | 6,399   | <0,001 | Yes         |
| M-432 vs. M-12  | 0,0103   | 10 | 0,167   | 1      | Do Not Test |
| M-432 vs. B-423 | 0,01     | 10 | 0,161   | 1      | Do Not Test |
| B-423 vs. M-21  | 0,387    | 10 | 6,238   | 0,001  | Yes         |
| B-423 vs. M-12  | 0,000333 | 10 | 0,00537 | 1      | Do Not Test |
| M-12 vs. M-21   | 0,387    | 10 | 6,233   | 0,001  | Yes         |

Tabela 51 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação os microrganismos e o pH 10

| Comparação      | Diferença entre médias | p  | q     | P      | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|----|-------|--------|--------------------------|
| B-423 vs. M-432 | 0,404                  | 10 | 6,507 | <0,001 | Yes                      |
| B-423 vs. B-414 | 0,332                  | 10 | 5,346 | 0,01   | Yes                      |
| B-423 vs. B-SC  | 0,242                  | 10 | 3,895 | 0,167  | No                       |
| B-423 vs. M-23  | 0,215                  | 10 | 3,466 | 0,308  | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-31  | 0,155                  | 10 | 2,498 | 0,754  | Do Not Test              |
| B-423 vs. B-424 | 0,135                  | 10 | 2,181 | 0,872  | Do Not Test              |



|                 |        |    |       |       |             |
|-----------------|--------|----|-------|-------|-------------|
| B-423 vs. M-21  | 0,0667 | 10 | 1,075 | 0,999 | Do Not Test |
| B-423 vs. M-12  | 0,0553 | 10 | 0,892 | 1     | Do Not Test |
| B-423 vs. B-422 | 0,0393 | 10 | 0,634 | 1     | Do Not Test |
| B-422 vs. M-432 | 0,364  | 10 | 5,873 | 0,003 | Yes         |
| B-422 vs. B-414 | 0,292  | 10 | 4,712 | 0,038 | Yes         |
| B-422 vs. B-SC  | 0,202  | 10 | 3,261 | 0,394 | Do Not Test |
| B-422 vs. M-23  | 0,176  | 10 | 2,832 | 0,6   | Do Not Test |
| B-422 vs. M-31  | 0,116  | 10 | 1,864 | 0,947 | Do Not Test |
| B-422 vs. B-424 | 0,096  | 10 | 1,547 | 0,984 | Do Not Test |
| B-422 vs. M-21  | 0,0273 | 10 | 0,441 | 1     | Do Not Test |
| B-422 vs. M-12  | 0,016  | 10 | 0,258 | 1     | Do Not Test |
| M-12 vs. M-432  | 0,348  | 10 | 5,615 | 0,005 | Yes         |
| M-12 vs. B-414  | 0,276  | 10 | 4,454 | 0,063 | No          |
| M-12 vs. B-SC   | 0,186  | 10 | 3,004 | 0,516 | Do Not Test |
| M-12 vs. M-23   | 0,16   | 10 | 2,574 | 0,721 | Do Not Test |
| M-12 vs. M-31   | 0,0997 | 10 | 1,607 | 0,98  | Do Not Test |
| M-12 vs. B-424  | 0,08   | 10 | 1,29  | 0,996 | Do Not Test |
| M-12 vs. M-21   | 0,0113 | 10 | 0,183 | 1     | Do Not Test |
| M-21 vs. M-432  | 0,337  | 10 | 5,432 | 0,008 | Yes         |
| M-21 vs. B-414  | 0,265  | 10 | 4,272 | 0,089 | Do Not Test |
| M-21 vs. B-SC   | 0,175  | 10 | 2,821 | 0,605 | Do Not Test |
| M-21 vs. M-23   | 0,148  | 10 | 2,391 | 0,798 | Do Not Test |
| M-21 vs. M-31   | 0,0883 | 10 | 1,424 | 0,991 | Do Not Test |
| M-21 vs. B-424  | 0,0687 | 10 | 1,107 | 0,999 | Do Not Test |
| B-424 vs. M-432 | 0,268  | 10 | 4,325 | 0,081 | No          |
| B-424 vs. B-414 | 0,196  | 10 | 3,165 | 0,439 | Do Not Test |
| B-424 vs. B-SC  | 0,106  | 10 | 1,714 | 0,969 | Do Not Test |
| B-424 vs. M-23  | 0,0797 | 10 | 1,284 | 0,996 | Do Not Test |
| B-424 vs. M-31  | 0,0197 | 10 | 0,317 | 1     | Do Not Test |
| M-31 vs. M-432  | 0,249  | 10 | 4,008 | 0,139 | Do Not Test |
| M-31 vs. B-414  | 0,177  | 10 | 2,848 | 0,592 | Do Not Test |
| M-31 vs. B-SC   | 0,0867 | 10 | 1,397 | 0,992 | Do Not Test |
| M-31 vs. M-23   | 0,06   | 10 | 0,967 | 1     | Do Not Test |
| M-23 vs. M-432  | 0,189  | 10 | 3,041 | 0,497 | Do Not Test |
| M-23 vs. B-414  | 0,117  | 10 | 1,881 | 0,944 | Do Not Test |
| M-23 vs. B-SC   | 0,0267 | 10 | 0,43  | 1     | Do Not Test |
| B-SC vs. M-432  | 0,162  | 10 | 2,611 | 0,704 | Do Not Test |
| B-SC vs. B-414  | 0,09   | 10 | 1,451 | 0,99  | Do Not Test |
| B-414 vs. M-432 | 0,072  | 10 | 1,161 | 0,998 | Do Not Test |

Tabela 52 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação os microrganismos e o pH 11

| Comparação      | Diferença entre médias | p  | q      | P     | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|----|--------|-------|--------------------------|
| B-422 vs. M-21  | 0,36                   | 10 | 5,797  | 0,003 | Yes                      |
| B-422 vs. M-432 | 0,147                  | 10 | 2,364  | 0,808 | No                       |
| B-422 vs. B-424 | 0,119                  | 10 | 1,918  | 0,937 | Do Not Test              |
| B-422 vs. M-31  | 0,117                  | 10 | 1,886  | 0,943 | Do Not Test              |
| B-422 vs. M-12  | 0,102                  | 10 | 1,65   | 0,976 | Do Not Test              |
| B-422 vs. B-414 | 0,0647                 | 10 | 1,042  | 0,999 | Do Not Test              |
| B-422 vs. B-SC  | 0,0433                 | 10 | 0,698  | 1     | Do Not Test              |
| B-422 vs. M-23  | 0,0377                 | 10 | 0,607  | 1     | Do Not Test              |
| B-422 vs. B-423 | 0,0353                 | 10 | 0,57   | 1     | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-21  | 0,324                  | 10 | 5,228  | 0,013 | Yes                      |
| B-423 vs. M-432 | 0,111                  | 10 | 1,795  | 0,958 | Do Not Test              |
| B-423 vs. B-424 | 0,0837                 | 10 | 1,349  | 0,994 | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-31  | 0,0817                 | 10 | 1,316  | 0,995 | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-12  | 0,067                  | 10 | 1,08   | 0,999 | Do Not Test              |
| B-423 vs. B-414 | 0,0293                 | 10 | 0,473  | 1     | Do Not Test              |
| B-423 vs. B-SC  | 0,008                  | 10 | 0,129  | 1     | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-23  | 0,00233                | 10 | 0,0376 | 1     | Do Not Test              |
| M-23 vs. M-21   | 0,322                  | 10 | 5,19   | 0,014 | Yes                      |
| M-23 vs. M-432  | 0,109                  | 10 | 1,757  | 0,963 | Do Not Test              |
| M-23 vs. B-424  | 0,0813                 | 10 | 1,311  | 0,995 | Do Not Test              |
| M-23 vs. M-31   | 0,0793                 | 10 | 1,279  | 0,996 | Do Not Test              |
| M-23 vs. M-12   | 0,0647                 | 10 | 1,042  | 0,999 | Do Not Test              |
| M-23 vs. B-414  | 0,027                  | 10 | 0,435  | 1     | Do Not Test              |
| M-23 vs. B-SC   | 0,00567                | 10 | 0,0913 | 1     | Do Not Test              |
| B-SC vs. M-21   | 0,316                  | 10 | 5,099  | 0,017 | Yes                      |
| B-SC vs. M-432  | 0,103                  | 10 | 1,666  | 0,974 | Do Not Test              |
| B-SC vs. B-424  | 0,0757                 | 10 | 1,22   | 0,997 | Do Not Test              |
| B-SC vs. M-31   | 0,0737                 | 10 | 1,187  | 0,998 | Do Not Test              |
| B-SC vs. M-12   | 0,059                  | 10 | 0,951  | 1     | Do Not Test              |
| B-SC vs. B-414  | 0,0213                 | 10 | 0,344  | 1     | Do Not Test              |
| B-414 vs. M-21  | 0,295                  | 10 | 4,755  | 0,035 | Yes                      |
| B-414 vs. M-432 | 0,082                  | 10 | 1,322  | 0,995 | Do Not Test              |
| B-414 vs. B-424 | 0,0543                 | 10 | 0,876  | 1     | Do Not Test              |
| B-414 vs. M-31  | 0,0523                 | 10 | 0,844  | 1     | Do Not Test              |
| B-414 vs. M-12  | 0,0377                 | 10 | 0,607  | 1     | Do Not Test              |
| M-12 vs. M-21   | 0,257                  | 10 | 4,148  | 0,11  | No                       |
| M-12 vs. M-432  | 0,0443                 | 10 | 0,715  | 1     | Do Not Test              |
| M-12 vs. B-424  | 0,0167                 | 10 | 0,269  | 1     | Do Not Test              |

|                 |        |    |        |       |             |
|-----------------|--------|----|--------|-------|-------------|
| M-12 vs. M-31   | 0,0147 | 10 | 0,236  | 1     | Do Not Test |
| M-31 vs. M-21   | 0,243  | 10 | 3,912  | 0,163 | Do Not Test |
| M-31 vs. M-432  | 0,0297 | 10 | 0,478  | 1     | Do Not Test |
| M-31 vs. B-424  | 0,002  | 10 | 0,0322 | 1     | Do Not Test |
| B-424 vs. M-21  | 0,241  | 10 | 3,879  | 0,171 | Do Not Test |
| B-424 vs. M-432 | 0,0277 | 10 | 0,446  | 1     | Do Not Test |
| M-432 vs. M-21  | 0,213  | 10 | 3,433  | 0,321 | Do Not Test |

Tabela 53 - Comparação múltipla entre médias pelo Teste de Tukey - comparação os microrganismos e o pH 12

| Comparação      | Diferença entre médias | p  | q     | P     | Limite de decisão P<0,05 |
|-----------------|------------------------|----|-------|-------|--------------------------|
| M-12 vs. M-432  | 0,31                   | 10 | 4,992 | 0,021 | Yes                      |
| M-12 vs. M-31   | 0,265                  | 10 | 4,272 | 0,089 | No                       |
| M-12 vs. M-23   | 0,224                  | 10 | 3,611 | 0,254 | Do Not Test              |
| M-12 vs. B-414  | 0,166                  | 10 | 2,681 | 0,672 | Do Not Test              |
| M-12 vs. M-21   | 0,134                  | 10 | 2,165 | 0,876 | Do Not Test              |
| M-12 vs. B-424  | 0,119                  | 10 | 1,924 | 0,936 | Do Not Test              |
| M-12 vs. B-423  | 0,11                   | 10 | 1,768 | 0,962 | Do Not Test              |
| M-12 vs. B-422  | 0,0797                 | 10 | 1,284 | 0,996 | Do Not Test              |
| M-12 vs. B-SC   | 0,044                  | 10 | 0,709 | 1     | Do Not Test              |
| B-SC vs. M-432  | 0,266                  | 10 | 4,282 | 0,087 | No                       |
| B-SC vs. M-31   | 0,221                  | 10 | 3,562 | 0,272 | Do Not Test              |
| B-SC vs. M-23   | 0,18                   | 10 | 2,901 | 0,565 | Do Not Test              |
| B-SC vs. B-414  | 0,122                  | 10 | 1,972 | 0,926 | Do Not Test              |
| B-SC vs. M-21   | 0,0903                 | 10 | 1,456 | 0,99  | Do Not Test              |
| B-SC vs. B-424  | 0,0753                 | 10 | 1,214 | 0,997 | Do Not Test              |
| B-SC vs. B-423  | 0,0657                 | 10 | 1,058 | 0,999 | Do Not Test              |
| B-SC vs. B-422  | 0,0357                 | 10 | 0,575 | 1     | Do Not Test              |
| B-422 vs. M-432 | 0,23                   | 10 | 3,707 | 0,222 | Do Not Test              |
| B-422 vs. M-31  | 0,185                  | 10 | 2,987 | 0,523 | Do Not Test              |
| B-422 vs. M-23  | 0,144                  | 10 | 2,327 | 0,823 | Do Not Test              |
| B-422 vs. B-414 | 0,0867                 | 10 | 1,397 | 0,992 | Do Not Test              |
| B-422 vs. M-21  | 0,0547                 | 10 | 0,881 | 1     | Do Not Test              |
| B-422 vs. B-424 | 0,0397                 | 10 | 0,639 | 1     | Do Not Test              |
| B-422 vs. B-423 | 0,03                   | 10 | 0,484 | 1     | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-432 | 0,2                    | 10 | 3,224 | 0,411 | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-31  | 0,155                  | 10 | 2,504 | 0,752 | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-23  | 0,114                  | 10 | 1,843 | 0,951 | Do Not Test              |
| B-423 vs. B-414 | 0,0567                 | 10 | 0,913 | 1     | Do Not Test              |
| B-423 vs. M-21  | 0,0247                 | 10 | 0,398 | 1     | Do Not Test              |
| B-423 vs. B-424 | 0,00967                | 10 | 0,156 | 1     | Do Not Test              |

|                 |        |    |       |       |             |
|-----------------|--------|----|-------|-------|-------------|
| B-424 vs. M-432 | 0,19   | 10 | 3,068 | 0,484 | Do Not Test |
| B-424 vs. M-31  | 0,146  | 10 | 2,348 | 0,815 | Do Not Test |
| B-424 vs. M-23  | 0,105  | 10 | 1,687 | 0,972 | Do Not Test |
| B-424 vs. B-414 | 0,047  | 10 | 0,758 | 1     | Do Not Test |
| B-424 vs. M-21  | 0,015  | 10 | 0,242 | 1     | Do Not Test |
| M-21 vs. M-432  | 0,175  | 10 | 2,826 | 0,602 | Do Not Test |
| M-21 vs. M-31   | 0,131  | 10 | 2,106 | 0,893 | Do Not Test |
| M-21 vs. M-23   | 0,0897 | 10 | 1,445 | 0,99  | Do Not Test |
| M-21 vs. B-414  | 0,032  | 10 | 0,516 | 1     | Do Not Test |
| B-414 vs. M-432 | 0,143  | 10 | 2,31  | 0,828 | Do Not Test |
| B-414 vs. M-31  | 0,0987 | 10 | 1,59  | 0,981 | Do Not Test |
| B-414 vs. M-23  | 0,0577 | 10 | 0,93  | 1     | Do Not Test |
| M-23 vs. M-432  | 0,0857 | 10 | 1,381 | 0,993 | Do Not Test |
| M-23 vs. M-31   | 0,041  | 10 | 0,661 | 1     | Do Not Test |
| M-31 vs. M-432  | 0,0447 | 10 | 0,72  | 1     | Do Not Test |